

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie



Tereza Ulrichová

Makrocyclické komplexy jako modely vazby Cu(II) v cupredoxinech:

Pilotní studie

Macrocyclic complexes as models for copper(II) bonding in cupredoxins:

Proof of concept

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: prof. RNDr. Petr Hermann, Dr.

Konzultant: doc. RNDr. Miroslav Šulc, Ph.D.

Praha 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat všem, kteří mi v průběhu bakalářského studia pomohli k nabytí nesčetného množství zkušeností a získání dat, které vedly k sepsání této práce, a také těm, kteří mě podporovali, abych se neustále rozvíjela a nadále se věnovala studiu chemie.

Největší poděkování patří mému školiteli prof. RNDr. Petrovi Hermannovi, Dr., který mi poskytl možnost proniknout do tajů organické a koordinační chemie. Děkuji ti, Petře, za odborné vedení mé bakalářské práce, svěřenou důvěru, ochotu a i čas, který jsi mi věnoval během sáhodlouhých konzultací. Též děkuji doc. RNDr. Miroslavovi Šulcovi, Ph. D. za korektury mé práce. Děkuji též mockrát všem pracovníkům Katedry anorganické chemie, kteří se podíleli na vytvoření této práce.

Na závěr bych ráda poděkovala své rodině za podporu a vytvoření zázemí pro nerušené studium.

Abstrakt

V současné době se ke studiu kinetiky přenosu elektronů nejčastěji využívají modifikované elektron-transportní metaloproteiny s přítomností dvojmocné mědi v aktivním centru. Jedním ze studovaných modelových proteinů je „cupredoxin“ azurin z *P. aeruginosa*, ve kterém je Cu(II) koordinována atomy postranních řetězců His⁴⁶, His¹¹⁷, Cys¹¹², Met¹²¹ a karbonylem Gly⁴⁵. Standardní redoxní potenciál azurinu je přibližně 310–360 mV (v závislosti na experimentálním provedení a stanovení). Cílem této práce bylo připravit makrocyclický ligand, 1-[1*H*-imidazol-2-yl)methyl]-1,4,7-triazacyclononanu (**L^{IM}**), který by byl schopný dostatečně stabilně komplexovat ion mědi a který by odhalil možnost použití makrocyclických komplexů jako nízkomolekulárních modelů aktivních míst proteinů. Ligand byl připraven použitím pěti krokové syntézy s využitím chránění makrocyclu, redukce a bromace 1*H*-imidazol-2-karbaldehydu a následné alkylační reakce. Posledním krokem bylo odstranění chránících skupin finálního makrocyclického ligandu. Meziprodukty jednotlivých reakčních kroků a finální ligand byly charakterizovány pomocí NMR a MS. Potenciometrickými titracemi byly stanoveny protonizační konstanty ligandu ($\log K_1 = 10,62$, $\log K_2 = 6,65$, $\log K_3 = 4,91$), které popisují acidobazické chování ligandu ve vodném prostředí. Obdobně byly studovány koordinační vlastnosti ligandu s vybranými ionty přechodných kovů (Cu²⁺, Zn²⁺). Rovnovážné konstanty stability potvrzují předpokládanou vysokou stabilitu měďnatých komplexů, která je podmínkou pro stanovení standardního redoxního potenciálu páru [CuL^{IM}]²⁺/[CuL^{IM}]⁺. Spektrofotometricky bylo ověřeno chování měďnatého komplexu ve vodném prostředí o různém pH dle speciace komplexu stanovené potenciometricky. Stanovení standardního redoxního potenciálu potvrdí nebo vyvrátí možnost využití úspěšně připraveného makrocyclického komplexu jako modelu aktivního místa azurinu.

Klíčová slova

přenos elektronů, azurin, makrocyclický komplex, měď

Abstract

Currently, modified electron transport metalloproteins with presence ion Cu(II) in their active site are most commonly used to study kinetics of electron transfer. One of the most studied model protein is cupredoxin azurin from *P. aeruginosa* with standard redox potential approximately 310–360 nm (depends on experimental conditions and techniques). Ion Cu(II) in azurin is coordinated by the side chain atoms of His⁴⁶, His¹¹⁷, Cys¹¹², Met¹²¹ and carbonyl of Gly⁴⁵. The aim of this work was to prepare macrocyclic ligand, 1-[1*H*-imidazol-2-yl)methyl]-1,4,7-triazacyclononanu (**L^{IM}**), which would be able to form stable complexes with both of copper ions Cu(II) and Cu(I). Such as macrocyclic complexes could be utilized as low molecular models of active sites in proteins. The ligand was prepared using five-step synthesis employing protection of macrocycle, reduction and subsequent bromination of 1*H*-imidazol-2-karbaldehyd, and following alkylation reaction. Deprotection of macrocycle revealed final product of ligand. All reaction intermediates and prepared ligand were characterized by NMR and MS. Potentiometric titrations determined ligand protonation constant ($\log K_1 = 10,62$, $\log K_2 = 6,65$, $\log K_3 = 4,91$), which describe acid-base properties of a ligand in an aqueous solution. Similarly, the coordination properties with selected transition metal ions (Cu²⁺ and Zn²⁺) were studied. Equilibrium stability constants show the expected high stability of copper complexes, which is a condition for determining the standard redox potential of the pair $[\text{CuL}^{\text{IM}}]^{2+}/[\text{CuL}^{\text{IM}}]^+$. The behavior of the copper complex in an aqueous solution with different pH according to the speciation of the complex (obtained by potentiometric titration) was verified spectrophotometrically. Determination of standard redox potential can confirm or exclude the possibility to utilize the successfully prepared macrocyclic complexes as a model of the azurine active site.

Keywords

electron transfer, azurin, macrocyclic complex, copper

[IN CZECH]

Obsah

1	SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ	10
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	14
2.1	ELEKTRONOVÝ PŘENOS V BIOLOGICKÝCH SYSTÉMECH - ÚVOD.....	14
2.1.1	<i>Vnitřní a vnější elektronový přenos</i>	<i>14</i>
2.1.2	<i>Mechanismy přenosu elektronů na delší vzdálenost.....</i>	<i>16</i>
2.1.3	<i>Poznatky ze studia přenosu elektronů v proteinech</i>	<i>18</i>
2.2	PROTEINY OBSAHUJÍCÍ MĚĎ	25
2.2.1	<i>Koordinační vlastnosti mědi</i>	<i>25</i>
2.2.2	<i>Typy kationtů mědi v proteinech a enzimech</i>	<i>28</i>
3	CÍLE PRÁCE.....	35
4	MATERIÁL A METODY	36
4.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	36
4.2	POUŽITÉ METODY A PŘÍSTROJE K CHARAKTERIZACI PŘIPRAVENÝCH LÁTEK.....	38
4.2.1	<i>Tenkvrstvá chromatografie (TLC)</i>	<i>38</i>
4.2.2	<i>Nukleární magnetická rezonance (NMR)</i>	<i>38</i>
4.2.3	<i>Hmotnostní spektrometrie (MS).....</i>	<i>39</i>
4.2.4	<i>Rentgenostrukturní analýza (RTG)</i>	<i>39</i>
4.2.5	<i>Elementární analýza (EA)</i>	<i>39</i>
4.3	POUŽITÉ METODY A PŘÍSTROJE K ANALÝZE ACIDOBAZICKÝCH, KOORDINAČNÍCH A SPEKTROSKOPICKÝCH VLASTNOSTÍ LÁTEK	40
4.3.1	<i>Potenciometrická titrace</i>	<i>40</i>
4.3.2	<i>UV/Vis spektrofotometrie</i>	<i>44</i>
5	VÝSLEDKY	45
5.1	VÝSLEDKY SYNTÉZ A CHARAKTERIZACE MEZIPRODUKTŮ A CÍLENÉ LÁTKY L^{IM}	45
5.1.1	<i>Syntéza látky Boc_2TACN</i>	<i>45</i>
5.1.2	<i>Syntéza látky $IM1$</i>	<i>46</i>
5.1.3	<i>Syntéza látky $IM2$</i>	<i>47</i>
5.1.4	<i>Syntéza látky $IM3$</i>	<i>48</i>
5.1.5	<i>Syntéza ligandu L^{IM}</i>	<i>51</i>
5.2	POTENCIOMETRICKÉ TITRACE	52
5.3	UV/VIS SPEKTROFOTOMETRIE.....	53
6	DISKUZE	55
6.1	SYNTÉZA	55
6.2	STUDIUM LIGANDU L^{IM} A JEHO KOMPLEXŮ V ROZTOKU	56

6.3	STANOVENÍ STANDARDNÍHO REDOXNÍHO POTENCIÁLU KOMPLEXU	63
7	ZÁVĚR	64
8	SEZNAM LITERATURY	65

1 Seznam zkratek a symbolů

(Boc) ₂ O	di- <i>t</i> -butyl-dikarbonát
*	označení excitovaného stavu
{H ¹ }	širokopásmový „dekaplink“ (z angl. <i>decoupling</i>) izotopu vodíku ¹ H
ΔE [J] či [eV]	energetický rozdíl mezi redoxními místy D a X _n
$\Delta_r G^0$ [J] či [eV]	standardní reakční Gibbsova energie
•	označení radikálu
A	akceptor elektronu
ACN	acetonitril
AcOH	kyselina octová
AO	askorbát oxidasa
Bipy	2,2'-bipyridin
Boc	chránicí skupina <i>t</i> -butyloxy-karbonyl
Boc ₂ TACN	di- <i>t</i> -butyl 1,4,7-triazacyklononan-1,4-dikarboxylát
BOD	bilirubinoxidasa
c [mol·dm ⁻³]	molární koncentrace
c_L [mol·dm ⁻³]	molární koncentrace ligandu
c_M [mol·dm ⁻³]	molární koncentrace kationtu přechodného kovu
Cp	ceruloplasmin
cyt <i>c</i>	cytochrom <i>c</i>
D	donor elektronu
DCM	dichloromethan
Dmp	4,7-dimethyl-1,10-fenantrolin
E [V]	rovnovážné napětí článku
$E^0_{\text{ox/red}}$ [V]	standardní redukční (redoxní) potenciál
E_C	potenciálová bariéra mezi redoxními místy D a A
E_{rov}^0 [V]	standardní rovnovážné napětí článku
ESI	ionizace elektrosprejem
ET	přenos elektronů (z angl. <i>electron transfer</i>)
Et ₃ N	trimethylamin

ETC	elektronový transportní řetězec (z angl. <i>electron transport chain</i>)
EtOAc	ethylacetát
F [$C \cdot mol^{-1}$]	Faradayova konstanta
FADH ₂	flavinadenindinukleotid (redukovaný)
GalOD	galaktosaoxidasa
h [J·s]	Planckova konstanta
HiPIP	Fe-S protein s vysokým potenciálem (z angl. <i>High-Potencial Iron-Sulfur Protein</i>)
I [$mol \cdot dm^{-3}$]	iontová síla
IM1	2-hydroxy-methyl-1 <i>H</i> -imidazol
IM2	2-(bromomethyl)-1 <i>H</i> -imidazol
IM3	di- <i>t</i> -butyl 7-[(1 <i>H</i> -imidazol-2-yl)methyl]-1,4,7-triazacyklononan-1,4-dikarboxylát
<i>i</i> PrOH	propan-2-ol (isopropylalkohol)
IT	iontová past (z angl. <i>ion-trap</i>)
J_A a J_B	konstanty popisující kyselou a bazickou chybu indikační skleněné elektrody
k_B [s^{-1}]	rychlostní konstanta
K_W	iontový součin vody
K_y	postupná (konsekutivní) protonizační konstanta ligandu
K'_x	postupná (konsekutivní) rovnovážná konstanta stability komplexu
L	ligand
l [mm]	délka
Lc	lakasa
L^{IM}	1-[1 <i>H</i> -imidazol-2-yl)methyl]-1,4,7-triazacyklononan
LMCT	přenos náboje z ligandu na kov (z angl. <i>ligand-to-metal-charge-transfer</i>)
M	ion přechodného kovu
M [$g \cdot mol^{-1}$]	molární hmotnost
m [kg]	hmotnost
Meim	(<i>N</i> -methyl)-imidazol

MeOH	methanol
MLCT	přenos náboje z kovu na ligand (z angl. <i>metal-to-ligand-charge-transfer</i>)
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. <i>mass spectrometry</i>)
MTHF	2-methyltetrahydrofuran
NAD(P)H	nikotinamidadeninukleotid(fosfát) (redukovaný)
NMe ₄ Cl	chlorid tetramethylamonný
NMe ₄ OH	hydroxid tetramethylamonný
NMR	nukleární magnetická rezonance
p. a.	čistota chemikálií pro analýzu (z angl. <i>per analysis</i>)
R_{DA} [Å]	vzdálenost donoru a akceptoru elektronů
R_f	retenční faktor
RT	laboratorní/pokojová teplota (z angl. <i>room temperature</i>); použito v reakčních schématech
RVO	rotační vakuová odparka
S	tzv. Nernstova směrice
t [°C]	(Celsiova) teplota
T [K]	termodynamická teplota
t [s]	čas
TACN	1,4,7-triazacycklononan
<i>t</i> BuOH	2-methylpropan-2-ol (<i>t</i> -butanol)
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie (z angl. <i>thin-layer chromatography</i>)
TX (T1, T2, T3)	označuje typ kationtu mědi
UV	ultrafialová oblast elektromagnetického záření
UV	ultrafialová oblast elektromagnetického záření
V [m ³]	objem
Vis	viditelná oblast elektromagnetického záření
V_M [ml]	mrtvý objem kolony
w [% (w/v)] či [ppm]	hmotnostní zlomek vyjádřený v procentech či v ppm
X_n	meziprodukt, kde je elektron během přenosu dočasně lokalizován

Z	počet vyměněných elektronů mezi donorem a akceptorem
β [\AA^{-1}]	rozpadová konstanta
β_{MHL}	celková rovnovážná konstanta protonizovaného komplexu
β_y	celková protonizační konstanta ligandu
β'_x	celková rovnovážná konstanta stability komplexu
δ [ppm]	chemický posun (v spektroskopii NMR)
ε [$\text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$]	molární absorpční koeficient
λ [nm]	vlnová délka
M	označení pro můstkový ligand
ν [Hz]	frekvence fotonu

2 Literární přehled

2.1 Elektronový přenos v biologických systémech - úvod

Mezi základní atributy živého organismu patří jak jeho metabolismus (anabolismus a katabolismus), tak i schopnost interagovat s vnějším prostředím, čímž je zajištěna látková i energetická výměna. Klíčové děje anabolismu i katabolismu jsou založeny na přenosu elektronů (ET, z angl. *electron transfer*) na finální akceptor. Tento přenos je zprostředkován multienzymatickým komplexem, ať již na thylakoidní či na vnitřní mitochondriální membráně. Příkladem prvého je fotosyntéza, což je děj, při kterém fototrofní organismy přeměňují energii slunečního záření ($E = h \cdot \nu$) na chemickou energii a z látek jednodušších vznikají látky složitější. Podobně posledním krokem katabolismu může být oxidace redukovaných kofaktorů (NAD(P)H, FADH₂) jako nositelů, a tedy i donorů, elektronů a protonů v tzv. elektronovém transportním řetězci (ETC, z angl. *electron transport chain*), např. u člověka dýchací řetězec.

2.1.1 Vnitřní a vnější elektronový přenos

Rozdělení přenosu elektronů podle jeho mechanismu na tzv. „vnitřní“ ET (z angl. *inner-sphere electron transfer*, někdy též *bonded electron transfer*) a „vnější“ ET (z angl. *outer-sphere electron transfer*) vychází ze studie redoxních reakcí mezi anorganickými sloučeninami [1].

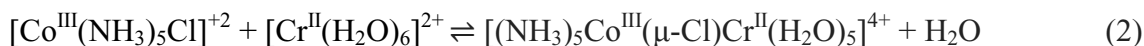
Definice byla zavedena H. Taube v roce 1953. Při „vnitřním“ ET dochází ke vzniku meziprojektu, kde jsou donor a akceptor spojeny můstkovým ligandem, přes který se elektron přenáší, z toho plyne omezení na vzdálenost, přes kterou se elektron přenáší. Příkladem je následující redoxní reakce (1) a její jednotlivé kroky (2)–(5), str. 15, ve které se Co³⁺ redukuje na Co²⁺ a Cr²⁺ oxiduje na Cr³⁺, a zároveň dochází k substituci ligandů v obou komplexech. Mechanismus přenosu chloridového aniontu z kobaltitého komplexu na chromnatý komplex byl vysvětlen tím, že dochází ke vzniku přechodného (z angl. *transition*) stavu, kde jsou oba komplexy spojeny právě tímto chloridovým iontem (viz Obr. 1, str. 15), který se nemůže dekoordinovat z prvního komplexu, dokud nedojde k redukci Co³⁺ na Co²⁺, a zároveň se nemůže stabilně vázat v druhém komplexu, dokud nedojde k oxidaci Cr²⁺ na Cr³⁺. Příkladem reakce, při které nedochází k substituci ligandů mezi komplexními částicemi je přenos elektronu mezi komplexními částicemi [Fe(CN)₆]³⁻ a [Co(CN)₅]³⁻ [2].

CELKOVÁ REAKCE:



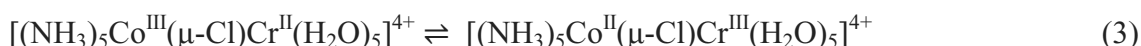
JEDNOTLIVÉ KROKY REAKCE:

a) Tvorba meziprojektu (Obr. 1) s můstkovým ligandem:

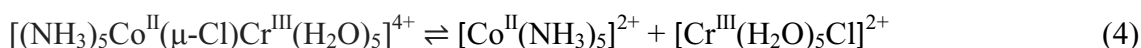


$\mu\text{-Cl} \rightarrow \mu$ označuje můstkový ligand

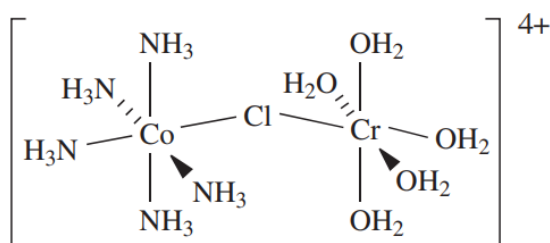
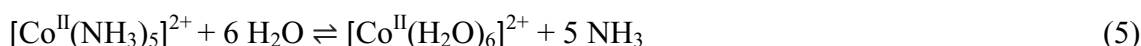
b) Elektronový přenos – samotná redoxní reakce:



c) Samovolný rozpad meziprojektu na produkty:



d) Rychlá hydrolyza kobaltnatého komplexu:



Obr. 1: Strukturální vzorec termodynamicky nestabilního meziprojektu redoxní reakce (1). Kobaltitý komplex je spojen s chromnatým komplexem můstkovým ligandem, kterým je chloridový anion. Přítomnost můstkového ligandu je typická pro přenosu elektronů „vnitřním“ mechanismem. Obrázek převzat ze zdroje [2] dne 23. 7. 2020.

Tento mechanismus však většinou není aplikovatelný na biologické systémy, ve kterých jsou elektrony přenášeny mezi redoxními místy, která jsou součástí aktivních center proteinů, nebo mezi kofaktory enzymů s koordinovanými kovovými kationty. Vzhledem k tomu, že tato místa bývají obvykle lokalizována uvnitř objemných proteinů, které je svým způsobem i chrání, je zamezena možnost vzniku přechodného stavu, kde by redoxní místa byla spojena chemickou kovalentní vazbou. Proto musí být elektrony přenášeny jiným mechanismem [1], [2].

Mechanismus „vnějšího“ ET je charakterizován přenosem elektronů z donoru na akceptor, přičemž partneři redoxního děje nejsou spojeny můstkovými ligandy. Při tomto ději se elektron přenáší prostorem obvykle na delší vzdálenosti a je zásadní právě pro výše zmíněné děje, tj. fotosyntézu, dýchací řetězec a mnoho dalších [1], [2].

2.1.2 Mechanismy přenosu elektronů na delší vzdálenost

Elektrony se v proteinech nebo i v celých multienzymatických systémech přenáší mezi redoxními místy, která od sebe mohou být vzdálené až $\approx 25 \text{ \AA}$ [3]. V případě vícekrokového mechanismu popisovaném níže mohou být vzdálenosti dokonce větší. Pro překonání velkých vzdáleností využívají elektrony dva konkurenční mechanismy: přímé jednokrokové kvantové „tunelování“ (z angl. *tunneling*) prostorem od donoru (D) k akceptoru elektronů (A) $[D \rightarrow A]$ nebo několik po sobě následujících jednokrokových přenosů tzv. „poskakování“ (z angl. *hopping*) $[D \rightarrow X_1 \rightarrow X_2 \rightarrow \dots \rightarrow A]$, v některých zdrojích [4] nazývané též vícekrokové „tunelování“, kde X_n představují meziprodukty, ve kterých je elektron přechodně lokalizován za vzniku struktury s nepárovým elektronem (radikál X^\bullet) [5]. Z experimentů na modelových peptidech vyplývá, že charakter meziprojektu, „přechodného můstku“, má zásadní vliv na rychlost intermolekulárního přenosu elektronů [6].

Elektron preferuje jeden z mechanismů v závislosti na prostorovém uspořádání redoxního místa a na jeho vlastnostech. Při „tepelném elektronovém přenosu“ (z angl. *thermal electron transfer*) je upřednostněno „poskakování“ před „tunelováním“, pokud je energetický rozdíl (ΔE) mezi redoxními místy D a X menší než potenciálová bariéra (E_C) $[\Delta E < E_C]$ mezi redoxními místy D a A. Vztah pro E_C lze vyjádřit aproximací (6):

$$E_C \approx (\Delta_r G^0/2) + (3/4) \cdot k_B \cdot T \cdot \beta \cdot R_{DA} \quad (6)$$

kde k_B (s^{-1}) je rychlostní konstanta, T (K) termodynamická teplota, β (\AA^{-1}) je rozpadová konstanta, jejíž hodnoty v proteinech se pohybují od $1,0$ – $1,4 \text{ \AA}^{-1}$. Vzdálenost donoru a akceptoru je vyjádřena R_{DA} (\AA). Standardní reakční Gibbsova energie $\Delta_r G^0$ je tzv. „hnací silou“ reakce (z angl. *driving force*) [5]. Obvykle se $\Delta_r G^0$ vyjadřuje v joulech (J), ale v následujícím textu budou hodnoty $\Delta_r G^0$ uvedeny v elektronvoltech (eV) ($1 \text{ eV} \approx 1,602 \cdot 10^{-19} \text{ J}$ [7]).

Funkční závislost standardní reakční Gibbsovy energie na rovnovážném napětí článku (E_{rov}^0) je vyjádřena rovnicí (7):

$$\Delta_r G^0 = -z \cdot E_{rov}^0 \cdot F \quad (7)$$

kde z je počet elektronů vyměněných mezi donorem (D) a akceptorem (A), rovnovážné napětí článku E_{rov}^0 (V) se dá vyjádřit jako rozdíl standardních redoxních potenciálů donoru (D) a akceptoru (A) a F je Faradayova konstanta ($96\,485\text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$).

V biomolekulách se při tepelném ET velikost $\Delta_r G^0$ pohybuje od $-0,4$ do $0,2$ eV [5], záleží však na podmínkách měření. Např. ve vodných roztocích nebo v organických rozpouštědlech je rozdílná protonace aminokyselinových postranních řetězců a také orientace polárních postranních řetězců aminokyselin v prostředí molekul vody v blízkosti redoxních míst. Vliv pH roztoku rovněž může tyto hodnoty podstatně ovlivnit.

Aproximaci (7) lze pro vyjádření potenciálové bariéry v proteinech ještě zjednodušit na rovnici (8), za předpokladu, že $\beta \approx 1\text{ \AA}^{-1}$ a teplota je $\approx 300\text{ K}$ ($\approx 27\text{ }^\circ\text{C}$):

$$E_C \approx (\Delta_r G^0/2) + R_{DA}/50 \quad (8)$$

Příkladem ET v biologických systémech může být ETC, kde vzdálenost mezi redoxními centry kofaktorů je menší než 14 \AA ($R_{DA} < 14\text{ \AA}$). Pro ET, kde $\Delta_r G^0 = 0\text{ eV}$ a $R_{DA} = 15\text{ \AA}$, pak je dle rovnice (8) potenciálová bariéra mezi A a D rovna $0,3\text{ eV}$ ($E_C = 0,3\text{ eV}$). Energetický rozdíl mezi D a X (postranní řetězce aminokyselin, kde by se mohl dočasně lokalizovat elektron) je většinou větší než $0,5\text{ eV}$, tzn. že energetický rozdíl D a X je větší než potenciálová bariéra ($\Delta E > E_C$), proto je v takovém případě upřednostněno tunelování [5].

2.1.3 Poznatky ze studia přenosu elektronů v proteinech

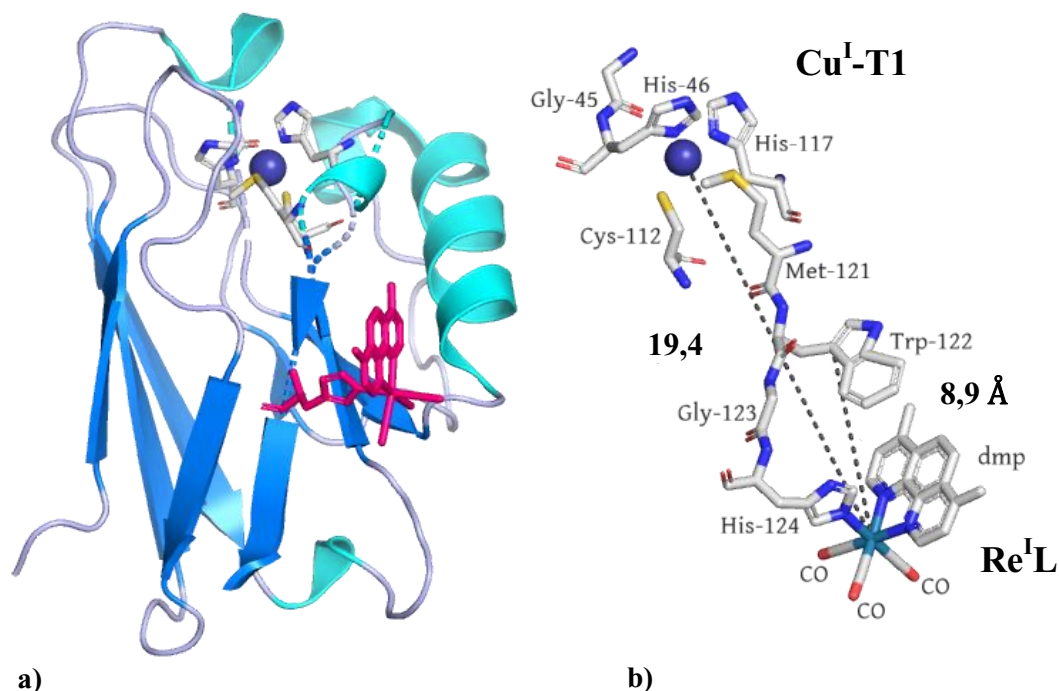
Obecné poznatky a představy o mechanismu ET v biologických systémech byly získány na základě studia modelových proteinů

Do studia mechanismu ET výrazně přispěli H. B. Gray a J. R. Winkler, kteří popsali kinetiku a definovali kinetické parametry těchto dějů na modelových příkladech. ET se většinou nedá studovat přímo na přirozených proteinech, proto se přednostně využívá jejich modifikace obvykle iontem přechodného kovu, který simuluje jedno z redoxních míst (donor nebo akceptor). Gray, Winkler a další spolupracovníci zvolili jako jeden z modelových příkladů bakteriální protein azurin. Azurin ve svém aktivním místě koordinuje ion mědi typu T1 (viz *Kapitola 2.2.2, str. 32*). Tvar koordinačního okolí je závislý na oxidačním stavu mědi. Stabilnější komplex s koordinačním číslem pět, který má tvar deformované trigonální bipyramidy vykazuje spíše měďnatý kation Cu^{2+} s koordinovanými aminokyselinovými zbytky His⁴⁶, His¹¹⁷, Cys¹¹², Met¹²¹ a karbonylem Gly⁴⁵. Měďný kation Cu^{1+} upřednostňuje spíše koordinaci se třemi (His⁴⁶, His¹¹⁷, Cys¹¹²) ligandy ve tvaru trigonálně planárním [3], [8].

ET indukovaný elektromagnetickým zářením¹ v modifikovaném azurinu probíhal mezi jednomocným rheniem v komplexu, který byl uměle zaveden do proteinu, a atomem jednomocné mědi v aktivním místě proteinu [3], [5]. Na iontu Re^I byly koordinovány tři molekuly CO, jedna molekula 4,7-dimethyl-1,10-fenantrolinu (= dmp, z angl. *4,7-dimethyl-1,10-phenantroline*) a imidazol postranního řetězce histidinu v poloze 124 (His¹²⁴), který je lokalizován na povrchu proteinu $[\text{Re}^I(\text{CO})_3(\text{dmp})(\text{His}^{124})]$ [3], viz *Obr. 2, str. 19*.

Pro výzkum ET v proteinech byla využita místně cílená záměna aminokyselin (z angl. *site directed mutagenesis*). Threnonin v místě 124 byl substituován histidinem (mutThr124His); histidin v místě 83 byl substituován za glutamin (mutHis83Gln) a v místě 122 primární struktury byl substituován Lys za Tyr, Trp anebo Phe (mutLys122Tyr/mutLys122Trp/mutLys122Phe). Substituce těchto aminokyselin byla provedena pro porovnání mechanismu ET v proteinu v závislosti na charakteru přestupního můstku (Tyr/Trp/Phe) ve vhodné vzdálenosti od donoru elektronu [3].

¹ ET indukovaný elektromagnetickým zářením (z angl. *photoinduced electron transfer*) předpokládá přenos elektronů z donoru, který je excitován světlem, na akceptor elektronů. Schopnost se excitovat elektromagnetickým zářením, tj. dostat elektron na vyšší energetickou hladinu, má například molekula chlorofylu *a*. Tento děj je zásadní při přeměně světelné energie na energii chemickou, příkladem jsou anabolické děje fotoautotrofních organismů, např. fixace CO_2 .



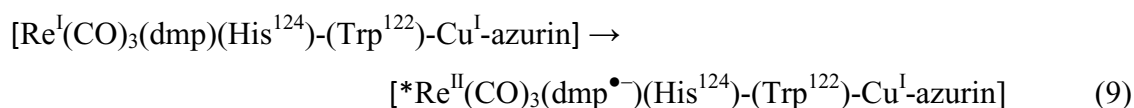
Obr. 2: Znáznornění struktury azurinu modifikovaného Re^{I} . Aminokyselinové zbytky podílející se na koordinaci iontu Cu^{I} , po oxidaci Cu^{II} , jsou znázorněny jako tyčinkový model (z angl. *sticks*): atomy C světle šedě, atomy N tmavě modře, atomy O červeně, atomy S žlutě. Ion Cu je znázorněn jako tmavě modrá kulička. **a)** Prvky sekundární struktury azurinu jsou znázorněny ve stuhové prezentaci následovně: α -helixy tyrkysově, β -skládané listy modře, smyčky bledě modře. Komplex s rheniem: $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3(\text{dmp})(\text{His}^{124})]$ je znázorněn růžově. **b)** Znáznornění části peptidu, podél kterého probíhá elektronový přenos. Aktivní místo azurinu obsahuje ion mědi typu T1 ($\text{Cu}^{\text{I-T1}}$), který je ve vzdálenosti 19,4 Å od Re^{I} koordinovaném v komplexu $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3(\text{dmp})(\text{His}^{124})] = \text{Re}^{\text{I-L}}$, dmp = 4,7-dimethyl-1,10-fenantrolin. Vzdálenost Re od indolového kruhu Trp-122 je 8,9 Å. Vzdálenosti byly změřeny v programu PyMOL. K vizualizaci proteinu a struktur v programu PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.3.3 Schrödinger, LLC) byla použita databáze PDB a struktura proteinu označeného za 2I7O.

Komplex s jednomocným rheniem byl excitován elektromagnetickým zářením, viz *rovnice (9)*, *str. 20*, přičemž elektron byl dočasně lokalizován v π -konjugovaném systému dmp, tento děj se označuje za MLCT^2 . Tento excitovaný systém je však v rovnováze se systémem, kde vznik aniontového radikálu $\text{dmp}^{\bullet-}$ je připisován elektronovému přenosu z Trp^{122} a ion $^*\text{Re}^{\text{II}}$ se dostává do svého základního stavu Re^{I} , viz *rovnice (10)*, *str. 20*. Tryptofanový kationtový radikál $(\text{Trp}^{122})^{\bullet+}$ je redukován jednomocnou mědí Cu^{I} , která se oxiduje na dvojmocnou Cu^{II} [3], viz *rovnice (11)*, *str. 20*.

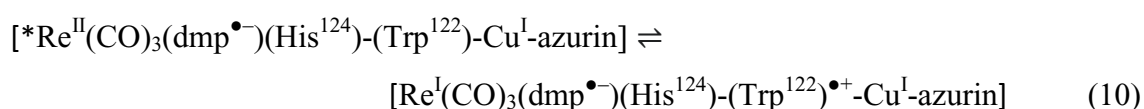
² MLCT znamená (z angl. *metal-to-ligand-charge-transfer*) přenos náboje, obvykle elektronu, z atomového orbitálu atomu kovu do molekulového orbitálu ligandu.

MECHANISMUS ET V MODIFIKOVANÉM AZURINU

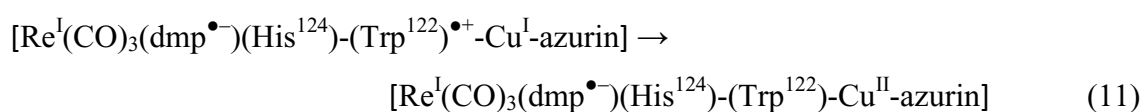
a) Excitace Re^{I} světelným zářením a dočasná lokalizace elektronu na dmp



b) Rovnováha excitovaného systému se systémem, kde se $*\text{Re}^{\text{II}}$ deexcituje na Re^{I}



c) Redoxní reakce: redukce $(\text{Trp}^{122})^{\bullet+}$ na Trp^{122} , oxidace Cu^{I} na Cu^{II}



Předpoklad průběhu mechanismu ET pomocí „poskakování“ přes Trp^{122} (či $\text{Tyr}^{122}/\text{Phe}^{122}$) byl potvrzen a mechanismus dvoukrokového „poskakování“, tzn. $\text{Cu}^{\text{I}} \rightarrow (\text{Trp}^{122})^{\bullet+} \rightarrow *\text{Re}^{\text{II}}$, je v tomto systému až $300\times$ rychlejší (dle literatury [5]), než když by byl upřednostněn mechanismus „tunelování“, tzn. $\text{Cu}^{\text{I}} \rightarrow *\text{Re}^{\text{II}}$. Podmínkou pro dvoukrokový mechanismus ET na vzdálenosti větší než 20 \AA je, aby rozdíl standardní Gibbsovy reakční energie ($\Delta_r G^0$) prvního endergonického kroku nebyl větší, než $0,2 \text{ eV}$. V tomto případě je $\Delta_r G^0$ přímo úměrná energetickému rozdílu $(\text{aminokyselina}^{122})^{\bullet+}/(\text{aminokyselina}^{122})^0$ a $*\text{Re}^{\text{II}}\text{L}/\text{Re}^{\text{I}}\text{L}$, kde L představuje ligandy komplexu [3].

Rentgenostrukturní analýza modifikovaného azurinu ukázala, že vzdálenost redoxních míst, tj. Re a Cu, je $19,4 \text{ \AA}$ a vzdálenost Re a Trp^{122} je $8,9 \text{ \AA}$. Potenciálová bariéra (E_C) mezi donorem a akceptorem byla stanovena výpočtem [5] a její hodnota je přibližně rovna $0,15 \text{ eV}$. Energetický rozdíl (ΔE) $(\text{Trp}^{122})^{\bullet+}/(\text{Trp}^{122})^0$ a $*\text{Re}^{\text{II}}\text{L}/\text{Re}^{\text{I}}\text{L}$ odpovídá zhruba $-0,03 \text{ eV}$, tzn., že $\Delta E < E_C$, což odpovídá předpokládanému mechanismu „poskakování“ [5].

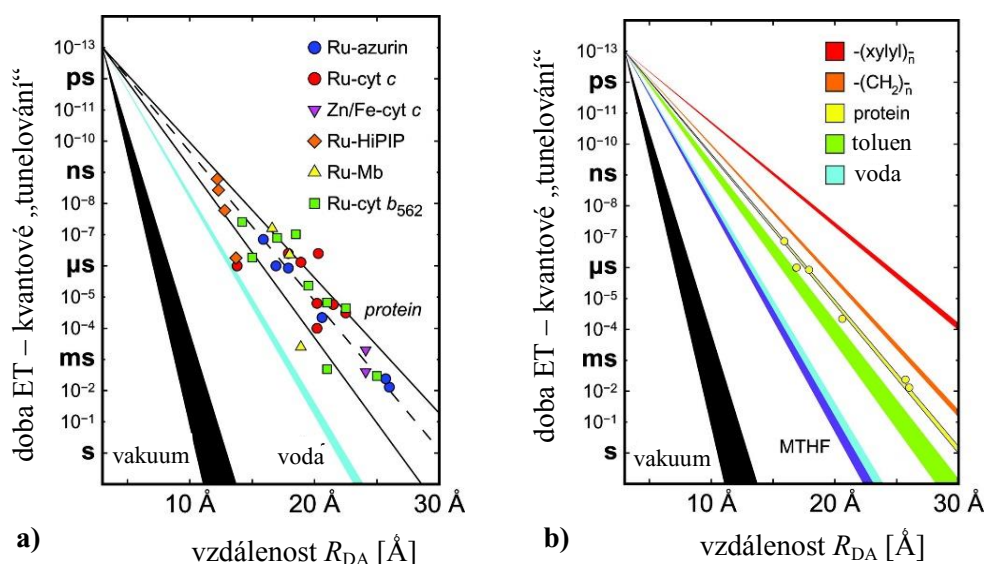
Pokud je v poloze 122 fenylalanin (nebo tyrosin) energetický rozdíl (ΔE) $(\text{Phe}^{122})^{\bullet+}/(\text{Phe}^{122})^0$ a $*\text{Re}^{\text{II}}\text{L}/\text{Re}^{\text{I}}\text{L}$ anebo $(\text{Tyr}^{122})^{\bullet+}/(\text{Tyr}^{122})^0$ a $*\text{Re}^{\text{II}}\text{L}/\text{Re}^{\text{I}}\text{L}$ má hodnotu zhruba $0,17 \text{ eV}$, tzn., že je vyšší o $0,20 \text{ eV}$ než v proteinu s Trp^{122} . Pokud je intermediátem Tyr či Phe, tak experimentální výsledky pak ukazují na velmi pomalý elektronový přenos mechanismem „poskakování“. ET v azurinu s Tyr^{122} či Phe^{122} je

na pomezí podmínky pro „poskakování“; energetický rozdíl (ΔE) je vyšší než potenciálová bariéra mezi Re a Cu (E_C), proto by měl být z kinetického hlediska (tzn., reakce by byla rychlejší) upřednostněn spíše mechanismus jednokrokového „tunelování“ [5].

Dalším příkladem využití modifikovaného proteinu pro studium ET, je cytochrom *c* modifikovaný rutheniem. Ruthenitý fragment $\text{Ru}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_5$ byl koordinován na histidin v poloze 33 na povrchu proteinu za vzniku $[(\text{NH}_3)_5\text{Ru}^{\text{III}}(\text{His}^{33})-\text{Fe}^{\text{II}}\text{-cyt } c]$. Kinetická studie Winklera a Graye z roku 1982 byla definitivním důkazem existence transportu elektronů na dlouhou vzdálenost. „Flash“ fotochemická indukce vstupu elektronu do takto modifikovaného cytochromu *c* vedla ke vzniku intermediátu $[(\text{NH}_3)_5\text{Ru}^{\text{II}}(\text{His}^{33})-\text{Fe}^{\text{III}}\text{-cyt } c]$, který zpětně relaxoval do termodynamicky stabilního produktu $[(\text{NH}_3)_5\text{Ru}^{\text{III}}(\text{His}^{33})-\text{Fe}^{\text{II}}\text{-cyt } c]$. Řešení struktury proteinu ukázalo, že vzdálenost Ru a Fe je 18 Å a jedinou možností transportu elektronů z Ru^{III} na Fe^{II} bylo kvantovou mechanikou popsané „tunelování“ [3], [4].

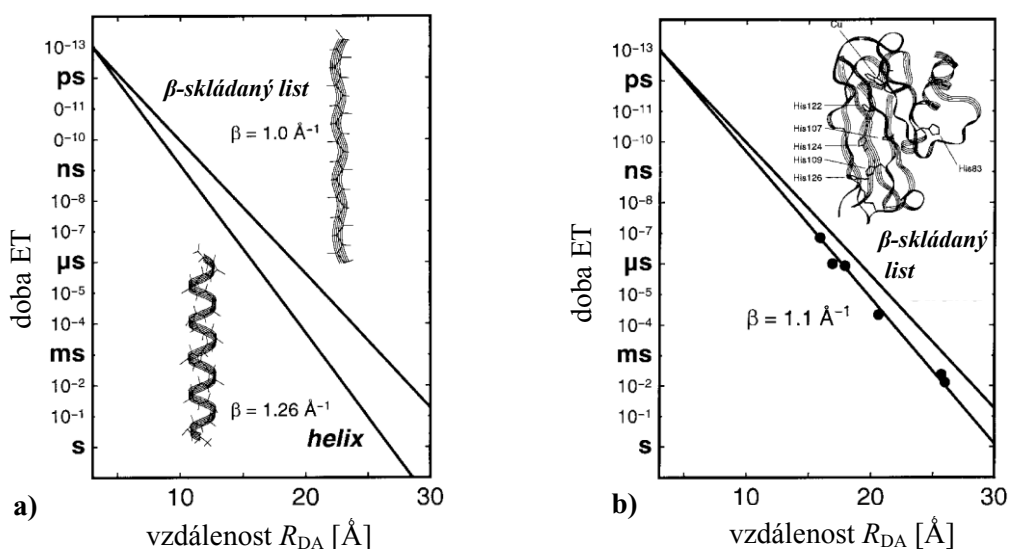
Winkler a Gray charakterizovali v následujících letech ET s vysokou „hnačí silou“ $\Delta_r G^0$ u více než 30 proteinů, které byly modifikovány rutheniem, a u kterých se vzdálenost donoru a akceptorovu, R_{DA} , pohybovala v rozmezí 1,2–2,6 nm, tj. 12–26 Å. Doba děje se pohybovala v rozmezí cca 7 řádů [9], viz *Obr. 3a*), *str. 22*.

Při studiu ET v proteinech je závislost doby transportu na vzdálenosti ovlivňována mnoha faktory. Postranní řetězce aminokyselin jsou fyzikálně, ale i chemicky odlišné, ovlivňují tak i finální terciální strukturu proteinu. V případě stejné vzdálenosti donoru a akceptoru redoxního páru, ale rozdílné dominující sekundární struktury (β -skládaného listu nebo α -helixu) je závislost zcela odlišná, viz *Obr. 4a*), *str. 22*. Odlišnosti ve funkční závislosti doby ET na vzdálenosti jsou patrné i v systémech, ve kterých donor a akceptor jsou spojeny strukturně stejnorodou a přesně definovanou „spojkou“, např. nasyceným uhlovodíkovým nebo xylenovým řetězcem [4], [9], viz *Obr. 3b*), *str. 22*.



Obr. 3: Závislost doby ET na vzdálenosti donoru a akceptoru elektronů.

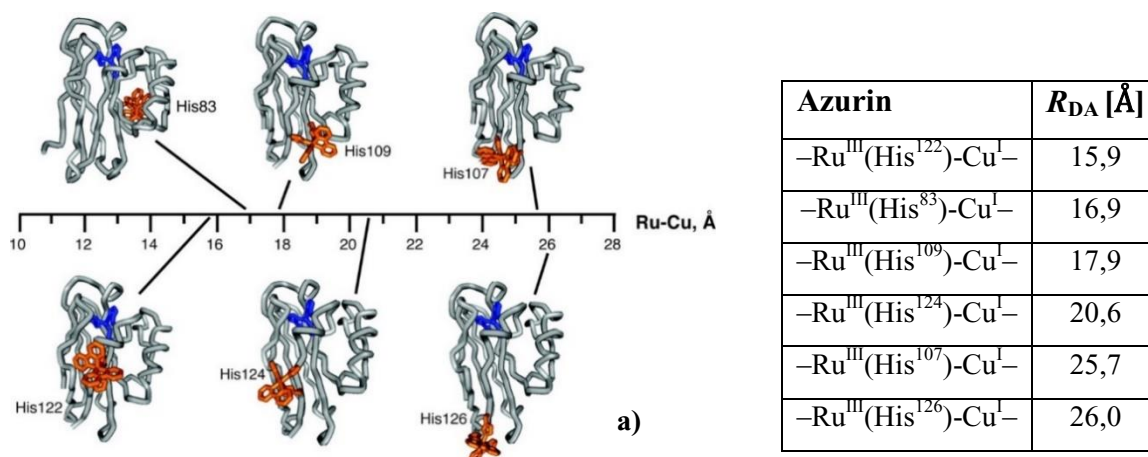
a) Výsledky studia kinetiky „intraproteinového“ ET v proteinech modifikovaných rutheniem: azurin modifikovaný rutheniem (modré kruhy); cytochrom *c* (červené kruhy); myoglobin (žluté trojúhelníky); cytochrom b_{562} (zelené čtverce); Fe-S protein s vysokým potenciálem, z angl. *High-Potencial Iron-Sulfur Protein* = HiPIP (oranžové kosočtverce); „interproteinového“ přenosu v krystalu Fe:Zn-cytochromu *c* (fialové trojúhelníky). **b)** Výsledky studia kinetiky ET v různých prostředích: vakuum (černá); zmrzlý 2-methyltetrahydrofuran = MTHF (tmavě modrá); led (azurová); zmrzlý toluen (zelená). Zároveň jsou červeně (xylylový můstek), oranžově (alkylový můstek) a žlutě (β -skládaný list azurinu modifikovaného rutheniem) znázorněny rozdílné závislosti dle struktur a můstků, přes které přenos probíhá. Obrázky převzaty ze zdroje [9] dne 6. 4. 2020.



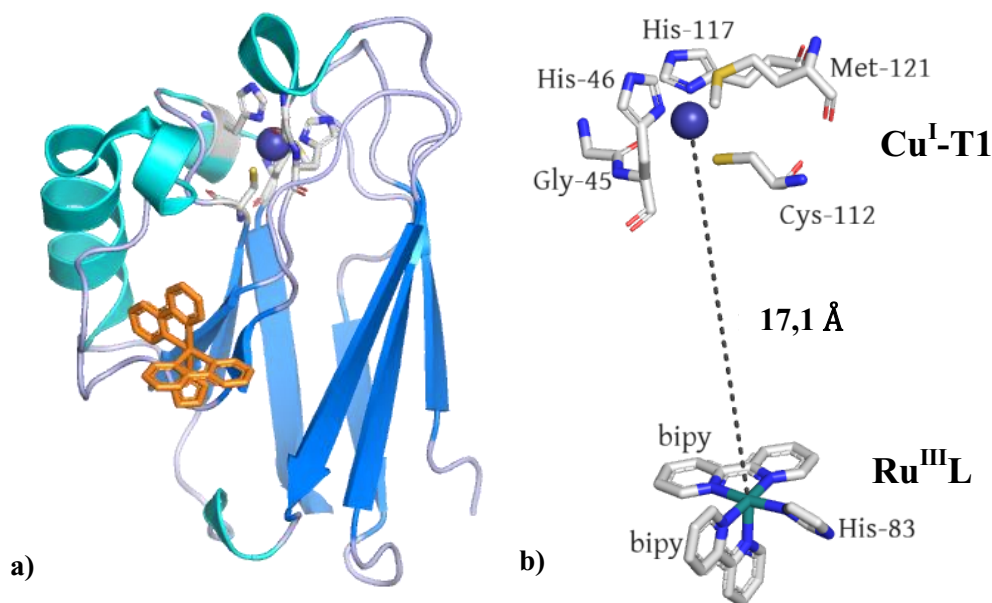
Obr. 4: Závislost doby ET na vzdálenosti donoru a akceptoru elektronů. **a)** Předpověď závislosti doby ET na vzdálenosti donoru a akceptoru v proteinu. Strmost přímky je dána sekundární strukturou proteinu. **b)** Závislost doby ET na vzdálenosti donoru a akceptoru v azurinu modifikovaném rutheniem. Ruthenium je koordinováno v odlišných vzdálenostech od aktivního centra proteinu. Vedle zjištěné závislosti, kde je rozpadová konstanta rovna $1,1 \text{ \AA}^{-1}$ ($\beta = 1,1 \text{ \AA}^{-1}$), je v grafu znázorněna předpovídaná funkční závislost času na vzdálenosti podél β -skládaného listu s rozpadovou konstantou $\beta = 1,0 \text{ \AA}^{-1}$. Obrázky převzaty ze zdroje [10] dne 9. 7. 2020.

Přestože struktura sbaleného (z angl. *folded*) proteinu významně ovlivňuje dobu ET, Winkler a Gray byli schopni změřit závislost rychlostní konstanty na vzdálenosti donoru a akceptoru [R_{DA}], viz *Obr. 4b*), *str. 22*, pouze na jednom proteinu, azurinu izolovaného z gramnegativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. V tomto proteinu bylo koordinováno trojmocné ruthenium (Ru^{III}) v různých vzdálenostech od jednomocné mědi (Cu^I) v aktivním místě azurinu [9], viz *Obr. 5*.

Azurin obsahuje kromě histidinů His^{46} a His^{117} , které se podílejí na koordinaci jednomocné mědi (Cu^I), další 2 histidiny, z nichž pouze His^{83} je na povrchu proteinu a je schopný se koordinovat atomem dusíku imidazolového kruhu na Ru^{III} použitého komplexu. Proto bylo navrženo pět mutantních proteinů se záměnou aminokyselin v β -skládaném listu za histidiny v různých vzdálenostech od aktivního místa: mutGln107His (glutamin v poloze 107 byl substituován histidinem), mutMet109His, mutLys122His, mutThr124His a mutThr126His. Dalšími ligandy, které koordinují trojmocné ruthenium, jsou dvě molekuly 2,2'-bipyridinu (bipy) a imidazolový kruh histidinu v poloze 83 [(bipy) $_2Ru^{III}(His^{83})-Cu^I$ -azurin], viz *Obr. 6*, *str. 24*, a v připravených pozměněných proteinech v polohách substituce X, kde X = 107, 109, 122, 124, 126 [(bipy) $_2Ru^{III}(His^X)-Cu^I$ -azurin] [3], [9]. Schematicky je znázorněna vzdálenost donoru a akceptoru v modifikovaných azurinech na *Obr. 5*.



Obr. 5: a): Vzdálenost R_{DA} (vyjádřena v Å) donoru a akceptoru, tj. Cu^I a Ru^{III} , a „páteří“ (z angl. *backbone*) struktury azurinu, kde modrou barvou je vyznačeno koordinační okolí jednomocné mědi a oranžovou barvou koordinační okolí trojmocného ruthenia, které je koordinováno atomem dusíku imidazolového kruhu histidinu v polohách znázorněných v primární sekvenci proteinu. b) Tabulka hodnot vzdáleností R_{DA} u jednotlivých mutantních azurinu. Obrázek a data převzata ze zdroje [9] dne 17. 5. 2020.



Obr. 6: Znázornění struktury azurinu modifikovaného trojmocným rutheniem Ru^{III} . Aminokyselinové postranní řetězce: His¹¹⁷, His⁴⁶, Cys¹¹² podílející se na koordinaci Cu^{I} (ion mědi po oxidaci na Cu^{II} upřednostňuje koordináční okolí s dalšími dvěma ligandy: Met¹²¹, Gly⁴⁵), jsou znázorněny jako tyčinkový model (z angl. *sticks*): atomy C světle šedě, atomy N tmavě modře, atomy O červeně, atomy S žlutě. Kation Cu je znázorněn jako tmavě modrá kulička. **a)** Prvky sekundární struktury azurinu jsou znázorněny ve stuhové prezentaci následovně: α -helixy tyrkysově, β -skládané listy modře, smyčky bledě modře. Komplex s rutheniem: $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{bipy})_2(\text{His}^{83})]$ je znázorněn oranžově. **b)** Aktivní místo azurinu obsahuje kation mědi typu T1 ($\text{Cu}^{\text{I}}\text{-T1}$), který je ve vzdálenosti 17,1 Å od trojmocného Ru^{III} koordinovaném v komplexu $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{bipy})_2(\text{His}^{83})] = \text{Ru}^{\text{III}}\text{L}$, bipy = 2,2'-bipyridinu. Vzdálenost byla změřena v programu PyMOL. K vizualizaci proteinu a struktur v programu PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.3.3 Schrödinger, LLC) byla použita databáze PDB a struktura proteinu označeného za 1JZE.

V připravených proteinech byla měřena závislost doby ET podél β -skládaného listu ($\text{Cu}^{\text{I}} \rightarrow \text{Ru}^{\text{III}}$) na vzdálenosti redoxních míst R_{DA} , kde D je jednomocná měď (Cu^{I}) a A je trojmocné ruthenium (Ru^{III}), tj. Cu^{I} se oxidovala na Cu^{II} a Ru^{III} se redukoval na Ru^{II} . Při měření byly optimalizovány podmínky: standardní reakční Gibbsova energie ($\Delta_r G^0 = -0,7 \text{ eV}$) a rozpadová konstanta ($\beta = 1,1 \text{ \AA}^{-1}$), viz Obr. 4b), str. 22. Ve zvolených experimentálních podmínkách byla závislost doby ET na vzdálenosti redoxních míst podobná výše uvedeným příkladům, kde redoxní místa byla propojena alifatickým nasyceným řetězcem $[-(\text{CH}_2)_n-]$ [3], [9], viz Obr. 3b), str. 22 (oranžová a žlutá plocha).

Ze studia ET systémů donor-můstek-akceptor vyplývají zákonitosti, které jsou aplikovatelné i na přirozené systémy přenosu elektronů v proteinech. Z výzkumu Winklera, Graye a spolupracovníků [4], [9], stejně tak z výzkumu Cordese a dalších,

kteří se také zabývali studiem intramolekulárního ET mechanismem „poskakování“ v peptidech [6] vyplývá, že aromatický charakter „přestupního můstku“ zajišťuje rychlejší přenos, na rozdíl od alifatických uhlovodíků či alifatických postranních řetězců aminokyselin. Přenos přes aromatické struktury je dobře patrný i v odlišném systému od proteinů, v dvoušroubovici DNA. Uvnitř šroubovice jsou nad sebou umístěny heterocyklické báze s delokalizovanými elektrony, které vytváří tzv. patrové interakce, z anglické literatury označované za „ π - π stacking interaction“. Na základě porovnání hodnot ionizačních energií alifatických ($\approx 9,6$ eV) a aromatických aminokyselin (Phe: 9,4 eV; Tyr: 8,5 eV; Trp: 7,8 eV) se předpokládá, že v proteinech budou pro přenos elektronů upřednostňovány aromatické aminokyseliny před alifatickými [4].

Obdobně vliv aromatických aminokyselin na přenos elektronů ilustruje výskyt aromatických aminokyselin v šesti třídách enzymů, kdy nepřekvapivě nejvyšší četnost aromatických aminokyselin vykazují oxidoreduktasy. Výsledky jsou vysvětlované tím, že hlavní úlohou oxidoreduktas je ET, a jak již bylo zmíněno, aromatické postranní řetězce ET urychlují. Příčina tak vysoké četnosti Trp, Tyr (ligasy mají také relativně vysokou četnost Tyr) a Phe v oxidoreduktasách se bohužel obtížně zkoumá, protože substituce aromatických aminokyselin za alifatické mění aminokyselinovou sekvenci oxidoreduktas, které tím ztrácí svou primární funkci (oxidovat/redukovat substrát). Kinetické parametry je možné zkoumat pouze u proteinů, které mají vysokým obsah aromatických postranních řetězců v porovnání s proteiny, které jich obsahují velmi málo [4].

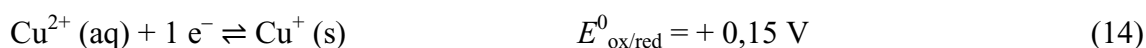
2.2 Proteiny obsahující měď

Druhým (po železe) nejhojněji se vyskytujícím přechodným kovem v živých organismech je měď, která se vyskytuje v organismu v řádech ppm (1 ppm = 1 mg v 1 kg/1 dm³ vodného roztoku), u 70 kg člověka se uvádí množství ≈ 70 mg. Je klíčovým kofaktorem řady enzymů a proteinů, které se účastní ET (modré proteiny), uskladnění a transportu kyslíku (hemocyanin) či transportu mědi (ceruloplasmin). Proteiny obsahující kovy se označují za tzv. metaloproteiny [11]–[13].

2.2.1 Koordinační vlastnosti mědi

Měď je relativně málo reaktivní prvek v porovnání s ostatními *d*-prvky. Vyskytuje se především ve dvou oxidačních stupních +I a +II. Obecně je stabilnější měď s oxidačním číslem +II. Standardní redoxní potenciály reakcí vypovídají o schopnosti redukované

formy se oxidovat, tzn. čím nižší je hodnota standardního redoxního potenciálu, tím silnějším redukčním činidlem je redukovaná forma. Hodnoty standardních redoxních potenciálů ($E^0_{\text{ox/red}}$) pro patříčné poloreakce jsou uvedeny u rovnic (12, 13, 14). Ve vodném roztoku je ion Cu^+ nestálý a disproportionuje dle rovnice (15), která je kombinací poloreakcí (12) a (14) [14].



Aby nedocházelo k disproportionaci, která je termodynamicky upřednostňována, může být Cu^I stabilizována několika způsoby, jako je srážení na nerozpustnou sůl, např. CuCl , nebo, ve vodném roztoku, tvorba komplexní částice, jako je např. $[\text{Cu}(\text{CN})_4]^{3-}$ [14].

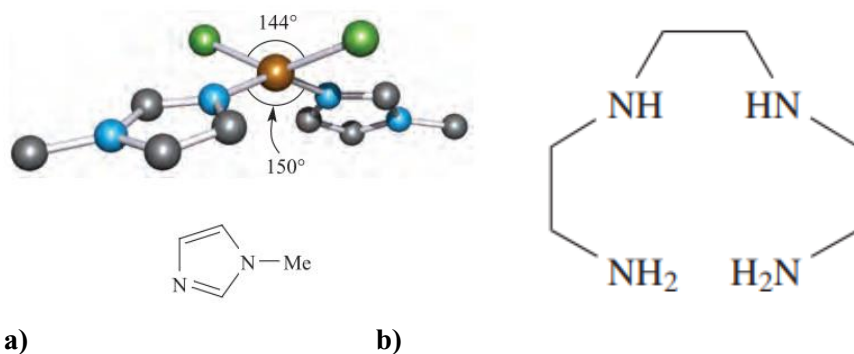
V následujících odstavcích budou stručně popsány možné oxidační stavy mědi.

Cu^{IV} se vyskytuje velmi vzácně např. ve formě $\text{Cs}_2[\text{CuF}_6]$, ion $[\text{CuF}_6]^{2-}$ tvoří nízkospinový komplex, ligandy jsou umístěny ve vrcholech oktaedru, ale díky Jahn-Tellerově distorzi je geometrické okolí charakteru tetragonální bipyramidy [14].

Oktaedrické okolí je typické pro Cu^{III} v komplexech $\text{Cs}_3[\text{CuF}_6]$ nebo $\text{K}_3[\text{CuF}_6]$. Čtvercově planární koordinační okolí má Cu^{III} ve sloučeninách $\text{K}[\text{CuO}_2]$ a $\text{K}_7[\text{Cu}(\text{IO}_6)]$. Mezi ligandy, které měď v oxidačním stavu +III stabilizují, patří 1,2-dithiooxalát. Komplexní anion $[\text{Cu}^{\text{III}}(\text{C}_2\text{O}_2\text{S}_2)_2]^-$ snadno podléhá fotoindukovanému dvouelektronovému intramolekulárnímu přenosu, při kterém dochází ke štěpení vazby C–C a uvolnění 2 ekvivalentů SCO [14].

Pro měď v oxidačním stavu +II konfigurace d^9 je známá celá řada jednoduchých i komplexních sloučenin. Oktaedrické uspořádání je deformováno Jahn-Tellerovou distorzi, avšak výsledný tvar koordinačního okolí závisí i na kationtech: např. u sloučeniny $[\text{Ph}_4\text{P}][\text{CuCl}_3]$ tvoří anion dimer, ale u $\text{K}[\text{CuCl}_3]$ je Cu^{II} v deformovaném oktaedrickém okolí. Velmi běžné jsou také komplexy s O- a N-donorovými ligandy, obvykle dominuje koordinační číslo 4 (tetraedr, čtverec),

5 (trigonální bipyramida, tetragonální pyramida) nebo 6 (oktaedr, trigonální prisma)³. Deformované tetraedrické uspořádání vykazuje komplex s koordinovanými *N*-methylimidazoly [CuCl₂(Meim)₂], viz Obr. 7a). Koordinaci do tetragonální pyramidy má komplexní kation [Cu(NCS-*N*)(triethylen-tetraamin)]⁺ s chelatujícím ligandem, viz Obr. 7b), který koordinuje měď tetradentátně. V tomto komplexu se na měď může slabou interakcí do druhé axiální polohy koordinovat molekula H₂O za vzniku deformovaného oktaedru [14].



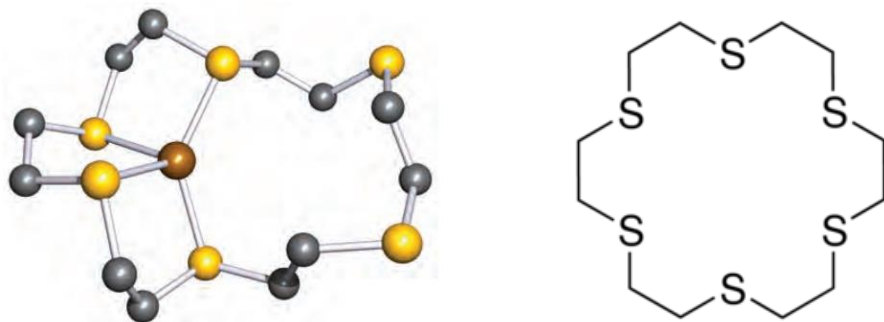
Obr. 7: **a)** Deformované tetraedrické uspořádání komplexu [CuCl₂(Meim)₂] a strukturální vzorec *N*-methylimidazolu; **b)** strukturální vzorec triethylen-tetraaminu, ligandu, který koordinuje Cu^{II} tetradentátně. Obrázek převzat ze zdroje [14] dne 6. 6. 2020.

Měď v oxidačním stavu +I má konfiguraci d^{10} a tvoří jednoduché i složitější sloučeniny. Na stabilitu Cu^I a Cu^{II} v roztoku mají vliv látky rozpuštěné v rozpouštědle (ionty, ligandy). Redoxní rovnováha mezi Cu^I a Cu^{II} se využívá i ke zjištění přítomnosti redukujících sacharidů v roztoku. Do roztoku se přidává tzv. Fehlingovo činidlo obsahující CuSO₄·5H₂O, NaOH a vínan sodno-draselný, který měď komplexuje. Cu²⁺ se v přítomnosti redukujících sacharidů (např. glukosa) redukuje za vzniku Cu₂O, během reakce dochází k barevné změně z modré na oranžovou až červenohnědou. V komplexních sloučeninách Cu^I vykazuje nejčastěji tetraedrál ní koordinaci (např. [Cu(CN)₄]³⁻), ale možná je i koordinace pouze tří ligandů do trigonálně planárního uspořádání (např. [Cu(CN)₃]²⁻). Cu^I je zároveň měkkou⁴ kyselinou, která tvoří stabilní komplexy s měkkými donorovými atomy jako je síra nebo fosfor, nicméně

³ V závorkách jsou uvedeny tvary koordinačních částic typických pro daná koordinační čísla v obecných souvislostech, měď v oxidačním stavu +II preferuje jen některé z nich.

⁴ Tento pojem vychází z definice teorie tvrdých a měkkých kyselin a bází. Tvrdé kyseliny/báze jsou takové, které mají malý poloměr s relativně vysokým nábojem a jsou slabě polarizovatelné, zatímco měkké kyseliny/báze mají velký poloměr, malý náboj a jsou silně polarizovatelné. Tvrdé kyseliny (kovové kationty) tvoří stabilnější komplexy s tvrdými bázemi (ligandy) a naopak. Zařazení jednotlivých centrálních atomů a ligandů do tříd není přesně definované.

komplexy s O- a N-donorovými ligandy jsou také známé. Velmi zajímavý je z hlediska koordinace komplex Cu^{I} s makrocyclickým ligandem obsahujícím 6 atomů síry, vzhledem k tomu, že Cu^{I} upřednostňuje tetraedrální okolí, koordinují se pouze na 4 z nich [14], viz *Obr. 8., str. 28.*



Obr. 8: Koordinace makrocyclického ligandu 1,4,7,10,13,16-hexathiocyclododekanu na $\text{Cu}(\text{I})$ do tetraedru a strukturní vzorec ligandu. Obrázek převzat ze zdroje [14], [15] dne 13. 6. 2020.

2.2.2 Typy kationtů mědi v proteinech a enzimech

Kationty mědi, které se vyskytují v proteinech, tedy především jednomocná a dvojmocná měď, vykazují speciální vlastnosti v závislosti na svém koordinačním okolí. Standardní redoxní potenciál páru $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ měřeného ve vodném prostředí proti standardní vodíkové elektrodě nabývá hodnoty 0,15 V, zatímco v proteinech může jeho hodnota vlivem různorodého prostředí aminokyselin a koordinačního okolí nabývat hodnot i vyšších než 0,5 V [11].

Proteiny obsahující kationty mědi se v druhé polovině 20. století začaly dělit do tří tříd dle spektroskopických vlastností, které odráží její geometrické uspořádání a elektronické vlastnosti: T1 (tzv. modrá měď, z angl. *blue copper*), T2 (tzv. normální „ne-modrá“ měď, z angl. *normal copper*, „*non-blue*“ *copper*) a T3 (protein obsahuje dinukleární komplex se dvěma kationty mědi, z angl. *coupled binuclear copper centres*). V následujících letech byla zavedena ještě jedna třída: klastry T2/T3, proteiny spadající do této třídy koordinují 3 kationty mědi do trinukleárního komplexu, z angl. *trinuclear copper cluster*. Klastř vzniká spojením typu 2 (T2) a 3 (T3) [11]. Shrnutí vlastností typů T1, T2, T3 a klastrů T2/T3 a příklady proteinů a enzymů jsou popsány v *Tab. 1, str. 29.*

Tab. 1: Shrnutí vlastností a základních poznatků o aktivních centrech proteinů a enzymů obsahujících měď. Charakteristiky převzaty a přeloženy z tabulek ze zdrojů [11], [13] dne 13. 6. 2020.

VLASTNOSTI	TYPY KATIONTŮ MĚDI			
	Typ 1 (T1)	Typ 2 (T2)	Typ 3 (T3)	Klastr T2/T3
Nuklearita komplexu⁵	Mononukleární	Mononukleární	Dinukleární	Trinukleární
Funkce	Přenos elektronů	Katalýza a aktivita v redoxních reakcích	Aktivace O ₂ pro transport a oxygenaci hemocyjaninu, tyrosinace	Aktivace O ₂ jako oxidační činidlo
Zástupci	Tzv. malé „modré“ proteiny (azurin, plastocyanin atd.), enzymy s více atomy mědi (z angl. <i>multicopper</i>) jkobsahující kombinaci více typů Cu	Aminoxidasa, galaktosaoxidasa, superoxid dismutasa	Hemocyanin, tyrosinasa	Enzymy s více atomy mědi
Typické koordinační číslo	Cu ²⁺ : 3 nebo 4 (případně 5 u azurinů)	Cu ²⁺ : 4 nebo 5	Cu ⁺ : 3 nebo 4	Cu ⁺ : 3
Tvar komplexu	Trigonálně planární nebo deformovaný tetraedr (případně deformovaná trigonální bipyramida u azurinů)	Čtvercově planární nebo deformovaná tetragonální pyramida	Trigonálně planární nebo tetragonální	Atomy mědi jsou uspořádány do trojúhelníku
Ligandy	Cys, His, (Met)	His, Asp (Tyr)	His (Tyr)	His
Absorpce světla	Intenzivní absorpce při $\lambda = 600$ nm (výjimečně při $\lambda = 450$ nm); LMCT (Cys \rightarrow Cu ²⁺)	Slabá absorpce při $\lambda \approx 700$ nm	Intenzivní absorpce při $\lambda = 300\text{--}400$ nm, LMCT (O ₂ ²⁻ \rightarrow Cu ²⁺)	Intenzivní absorpce v oblasti Vis; LMCT (O ₂ ²⁻ \rightarrow Cu ²⁺)

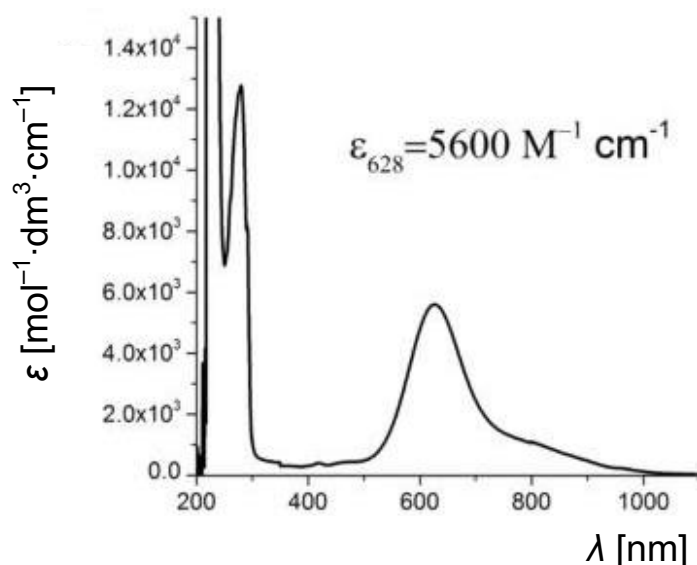
Kation mědi – typ 1 (T1)

Proteiny s koordinovanou mědí typu T1 absorbují světlo o vlnové délce (λ) cca 600 nm s molárním absorpčním koeficientem (ϵ) $\approx 5000 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{dm}^3\cdot\text{cm}^{-1}$, viz *Obr. 9. str. 30*. Tento absorpční pás vzniká v důsledku LMCT⁶, tj. přenosu elektronu z molekulového

⁵ Nuklearita komplexu vyjadřuje počet centrálních atomů, nejčastěji počet atomů přechodných kovů, které jsou v komplexu koordinovány s ligandy.

⁶ LMCT znamená (z angl. *ligand-to-metal charge-transfer*) přenos náboje, nejčastěji elektronu, z molekulového orbitálu ligandu na centrální atom (obvykle přechodný kov).

orbitalu thiolátové síry cysteinu do molekulového orbitalu mědi, což vede k jejich modrému zbarvení. Měď je koordinována dvěma histidiny a jedním cysteinem do trigonálně planárního tvaru, ale většinou se do axiální polohy koordinuje navíc atom síry methioninu, který je obvykle ve větší vzdálenosti. Ligandy jsou uspořádány ve tvaru deformovaného tetraedru (pro azuriny je typická slabá koordinace karbonylu Gly do páté polohy za vzniku deformované trigonální bipyramidy [8]) [11].

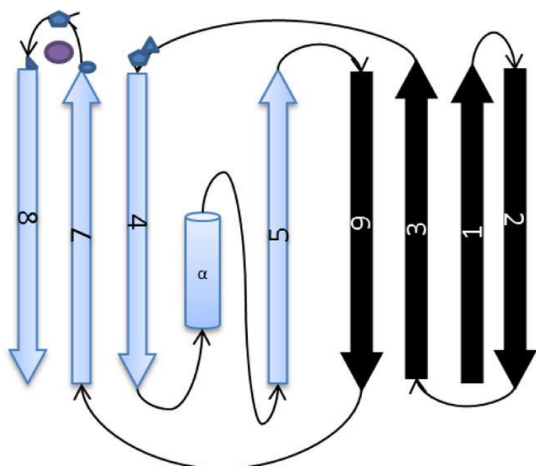


Obr. 9: Typická závislost molárního absorpčního koeficientu [$\text{mol}^{-1}\cdot\text{dm}^3\cdot\text{cm}^{-1}$] na vlnové délce [nm] pro tzv. modré proteiny v oxidovaném stavu (Cu^{II}). Pro tyto proteiny je typický pás s absorpčním maximem při vlnové délce $\lambda \approx 600$ nm a molárním absorpčním koeficientu $\varepsilon \approx 5000 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{dm}^3\cdot\text{cm}^{-1}$. Obrázek převzat ze zdroje [13] dne 23. 7. 2020.

Mononukleární azuriny, plastocyaniny, stellacyaniny, amycyanin a rusticyanin patří mezi proteiny obsahující Cu-T1, které se podílejí na intermolekulárním ET. Na intramolekulárním ET se podílejí enzymy s vyšším počtem kationtů mědi, z angl. *multicopper enzymes*, jako například askorbát oxidasa (AO), bilirubinoxidasa (BOD), lakasa (Lc), Cu-nitritreduktasa, ceruloplasmin (Cp), které oxidují substrát přijmutím elektronu v aktivním místě s monomolekulární mědí T1 a přenáší ho do trinukleárního klastru T2/T3. Vyjmenované enzymy, kromě BOD, mají více domén [11], [13], [16].

Přestože je aminokyselinová sekvence proteinů s mědí T1 shodná jen v 20 %, jejich sekundární struktura je téměř identická. Tyto modré proteiny se označují za tzv. „cupredoxiny“. Jejich sekundární struktura se skládá z osmi β -skládaných listů,

kteřé se formují do antiparalelního β -soudku s motivem řeckého klíče⁷ (z angl. *Greek Key beta barrel*), jehož topologie je znázorněna na Obr. 10. Dále obsahují jeden až dva α -helixy, které jsou umístěny mimo jádro (z angl. *core*) β -uspořádání [13].



Obr. 10: Diagram znázorňující topologii sekundární struktury azurinu. β -skládáné listy jsou znázorněny šipkami, α -helix je znázorněný válcem, ligandy ionu mědi jsou znázorněny modrými mnohoúhelníky, atom mědi typu T1 je znázorněný fialově. Obrázek převzat ze zdroje [13] dne 14. 6. 2020.

Hodnoty standardních redoxních potenciálů modrých proteinů se pohybují od 183 do 800 mV. Tento vysoký rozsah je způsoben koordinovanými ligandy v axiálních polohách u jednotlivých nativních proteinů. Proteiny, ve kterých se koordinuje do axiální polohy na kationtu mědi Gly, vykazují obecně nižší $E^0_{\text{ox/red}}$ (190–320 mV); ty, které koordinují Met, mají vyšší potenciál (183–670 mV). Nejvyšším $E^0_{\text{ox/red}}$ mají proteiny s více kationty mědi, ve kterých se do axiálních poloh nekoordinují žádné ligandy (354–800 mV) [13].

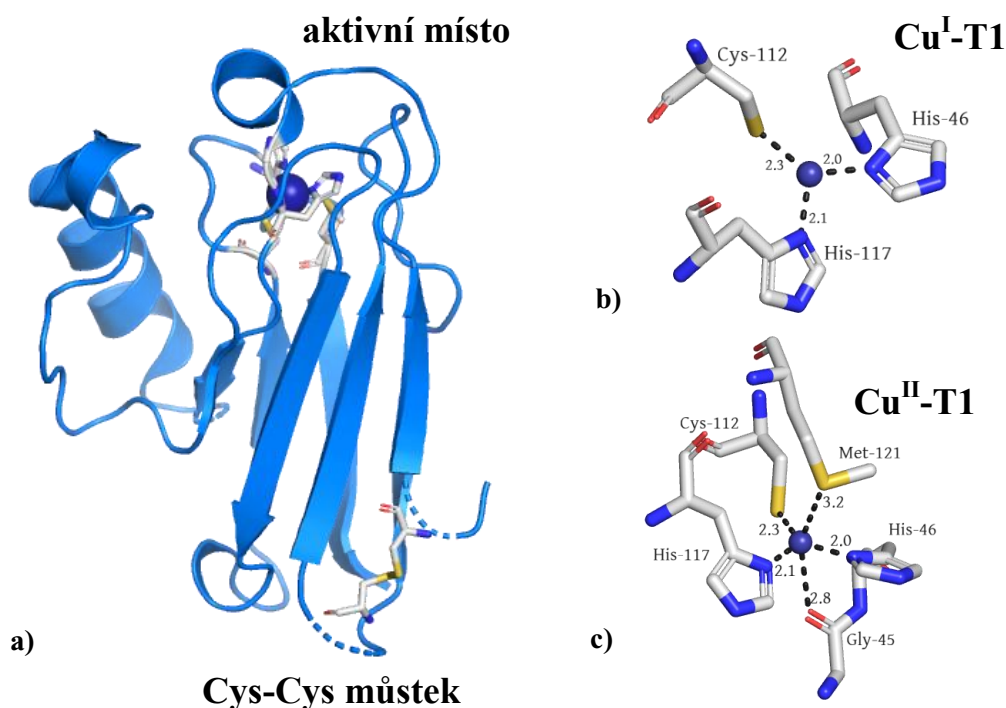
Azuriny jsou pravděpodobně nejvíce zkoumanými proteiny s koordinovaným kationtem mědi Cu-T1. Jedná se o poměrně malé bakteriální proteiny o velikostech od 9 do 14 kDa (1 Da = 1 g·mol⁻¹) a zároveň jsou jedny z nejjednodušších, které katalyzují redoxní reakce v mikroorganismech (např. v anaerobním dýchacím řetězci bakterií přenáší elektrony z cytochromu *c551* na nitrátreduktasu). Azurin slouží jako model pro zkoumání kinetiky ET, ale pro svou stabilitu a vratnou elektrochemickou reakci se využívá i jako biosenzor druhého druhu, který se imobilizuje na elektrodu a funguje jako prostředník elektronového přenosu mezi elektrodou a redoxním

⁷ β -souděk s motivem řeckého klíče je typ antiparalelního β -soudku, jehož β -skládáné listy nejsou všechny spojené vlásenkově (z angl. *hairpin*).

systemem (což mohou být např. enzymy) v roztoku [11]. Standardní redoxní potenciál $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ azurinu izolovaného z bakterie *Pseudomonas aeruginosa* je 310 mV [13].

Na měď typu T1 v redukovaném stavu Cu^{I} , která je součástí aktivního místa v azurinu, se na horním konci (viz *Obr. 11*) osmiřetězového antiparalelního β -soudku koordinují dva imidazoly histidinu (His^{46} a His^{117}) a thiolát cysteinu (Cys^{112}) do trigonálně planárního uspořádání, tj. ion mědi má koordinační číslo tři. V oxidovaném stavu se na Cu^{II} mohou koordinovat slabšími axiálními interakcemi atom síry z methioninu (Met^{121}) a atom karbonylového kyslíku z glycinu (Gly^{45}). V tomto případě je koordinační číslo mědi v komplexu pět a geometrické okolí je tvaru deformované trigonální bipyramidy [8].

Azurin obsahuje jeden disulfidový můstek $\text{Cys}^3\text{-Cys}^{26}$, viz *Obr. 11*, ve vzdálenosti 25,9 Å od Cu-T1, který může být redukován silným redukčním činidlem, za vzniku druhého redoxního centra, které umožňuje sledovat ET [17].



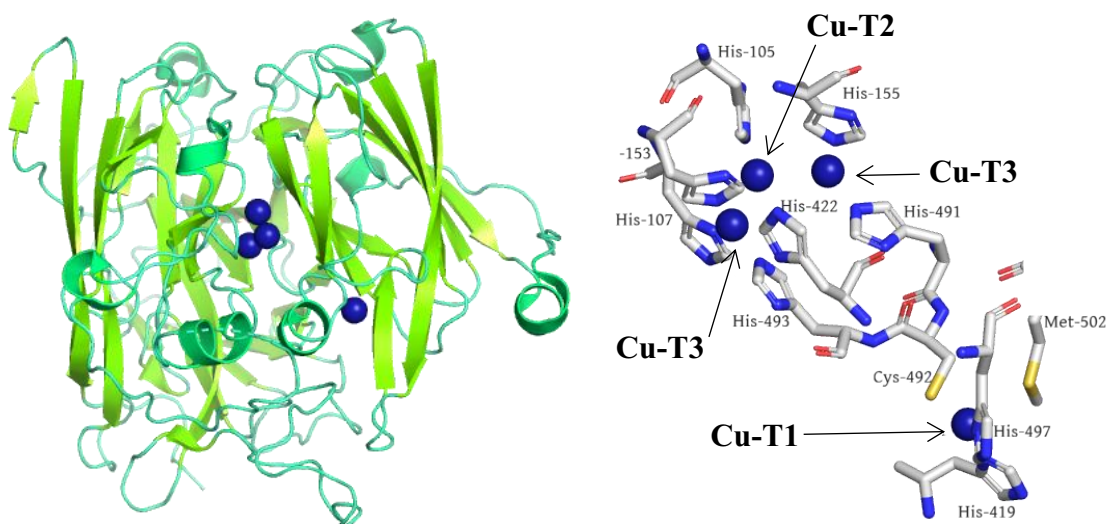
Obr. 11: Znáznornění struktury nativního azurinu bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Aminokyselinové zbytky podílející se na koordinaci kationtu mědi jsou znázorněny jako tyčinkový model (z angl. *sticks*): atomy C světle šedě, atomy N tmavě modře, atomy O červeně, atomy S žlutě. Kation mědi je znázorněn jako tmavě modrá kulička. **a)** Ve stuhové prezentaci struktury azurinu je z výrazně umístění disulfidového můstku $\text{Cys}^3\text{-Cys}^{26}$ a aktivního místa azurinu s kationtem $\text{Cu}\text{-T1}$. **b)** Preferované koordinační okolí Cu^{I} . **c)** Preferované koordinační okolí Cu^{II} . Vzdálenosti byly změřeny v programu PyMOL a jsou vyjádřeny v jednotkách Å. K vizualizaci proteinu a struktur v programu PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.3.3 Schrödinger, LLC) byla použita databáze PDB a struktura proteinu označeného za 4AZU.

Kation mědi – typ 2 (T2)

Proteiny s koordinovanou mědí typu T2 absorbují velmi slabě jen díky absorpci způsobené přechody elektronů v rámci d-orbitalů. Aktivní centrum s mědí typu dva se vyskytuje ve všech modrých enzymech s vyšším počtem atomů mědi (AO, BOD, Lc, Cp, Cu-nitritreduktasa), stejně tak v galaktosaoxidase (GalOD), Cu aminoxidase, Cu superoxid dismutase [11].

Kation mědi – typ 3 (T3)

Aktivní centrum s mědí typu T3 obsahuje dva atomy mědi spojené můstkovým ligandem. Protein je diamagnetický (všechny elektrony jsou spárované), absorbuje světlo v oblasti kolem 330 nm ($\lambda \approx 330$ nm) a zároveň je schopný fluoreskovat. Typ T3 je opět typický pro enzyme s více atomy Cu, stejně tak pro katecholoxidasu (tyrosinasu) a hemocyanin. Spojením center T2 a T3 vznikají klastry T2/T3 [11], které se vyskytují například ve struktuře enzymu lakasy, viz *Obr. 12*.



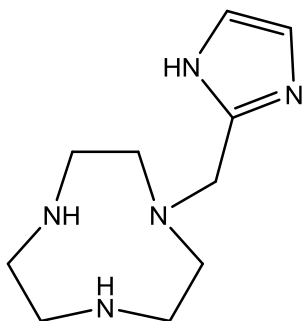
Obr. 12: Znázornění typů mědi T1, T2 a T3 na příkladu aktivního centra enzymu lakasy bakterie *Bacillus subtilis*. **a)** Struktura asymetrického monomeru lakasy se zřetelným znázorněním koordinace čtyř kationtů mědi tmavě modrou barvou. **b)** Aktivní místo lakasy. Kationty mědi jsou znázorněny jako tmavě modré kuličky. Cu-T1 je mononukleární paramagnetický „modrý“ ion mědi, který absorbuje světlo o $\lambda = 600$ nm a udává lakase modré zabarvení, typ T2 je monomolekulární paramagnetický „ne-modrý“ (z angl. *non-blue*) ion mědi, typ T3 se skládá z binukleárního diamagnetického páru iontů mědi, které vykazují spin-spinovou interakci mezi svými spinovými magnetickými momenty, absorbují v UV oblasti kolem 330 nm. Typ T2 a T3 spolu tvoří trinukleární klastr T2/T3. Aminokyselinové zbytky podílející se na koordinaci jednotlivých kationtů mědi jsou znázorněny jako tyčinkový model (z angl. *sticks*): atomy C světle šedě, atomy N modře, atomy O červeně, atomy S žlutě. Koordinační okolí jednotlivých typů mědi je ve shodě s *Tab. 1, str. 29*. K vizualizaci proteinu a struktur v programu PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.3.3 Schrödinger, LLC) byla použita databáze PDB a struktura proteinu označeného za 3ZDW.

V literatuře se někdy uvádí ještě další dva typy: binukleární Cu_A a tetranukleární Cu_Z . Typ Cu_A absorbuje silně při vlnové délce 480 a 530 nm a hraje významnou roli v přenosu elektronů. Měď Cu_A koordinují postranní řetězce His, Cys a případně Met. Koordinační okolí je trigonálně planární. Příkladem může být cytochrom *c* oxidasa. Typ Cu_Z silně absorbuje při vlnové délce 640 nm, na kation mědi se koordinuje His a S^{2-} a vytváří se klastry se 4 kationty mědi. Příkladem je enzym N_2O reduktasa. Jedná se o homodimer, který na jedné doméně váže dinukleární Cu_A a na druhé tetranukleární klastr $\text{Cu}_Z\text{-S}$ [13].

3 Cíle práce

Z literárního přehledu vyplývá, že kinetika ET byla zkoumána především na proteinech, které byly modifikovány komplexy s koordinovanými kationty přechodných kovů. Cílem této práce je syntéza ligandu, který by byl prvním krokem k podhalení použití makrocyclů pro komplexaci iontů mědi za vzniku komplexů, které mohou sloužit jako nízkomolekulární modely aktivních míst nativních proteinů.

Navrhovaný ligand, 1-[(1*H*-imidazol-2-yl)methyl]-1,4,7-triazacyklononan (L^{IM}), struktura ligandu je ukázána níže v *Obr. 13*), by měl představovat první velmi hrubé přiblížení koordinační sféry kationtu mědi typu T1 v aktivním místě azurinu.



Obr. 13: Struktura ligandu, 1-[(1*H*-imidazol-2-yl)methyl]-1,4,7-triazacyklononanu (L^{IM}). K vytvoření struktury byl použit program ChemDraw Professional 16.0 (PerkinElmer Informatics, Inc., Level Professional, Version 16.0.1.4).

Cíle práce:

- Syntéza 1-[(1*H*-imidazol-2-yl)methyl]-1,4,7-triazacyklononanu (L^{IM})
- Stanovení acidobazických vlastností ligandu (protonizační konstanty) potenciometrickou titrací
- Stanovení koordinačních vlastností ligandu (konstanty stability, distribuční diagramy) potenciometrickou titrací s vybranými kationty přechodných kovů
- Stanovení spektroskopických vlastností měďnatého komplexu
- Stanovení standardního redoxního potenciálu měďnatého komplexu

4 Materiál a metody

4.1 Použité chemikálie

Bezvodý tetrahydrofuran, který byl použitý při syntéze 2-hydroxy-methyl-1*H*-imidazolu (**IM1**), byl připraven pomocí kovového sodíku (3 dny míchání při laboratorní teplotě = RT, z angl. *room temperature*) s následnou destilací za normálního tlaku. Ostatní rozpouštědla nebyla před použitím čištěna ani sušena. Ethanol a deionizovaná voda byly dostupné na Katedře anorganické chemie PřF UK. Chlorid tetramethylamonný (NMe₄Cl) a hydroxid tetramethylamonný (NMe₄OH) byly připravovány RNDr. Janou Havlíčkovou dle standardních postupů pro přípravu roztoků k potenciometrickým titracím na Katedře anorganické chemie PřF UK. Všechny ostatní chemikálie byly použity v čistotě p. a. (pro analýzu, z lat. *per analysis*) či vyšší kvalitě.

NÁZEV	VÝROBCE	ZEMĚ
1,4,7-triazacyklononan	CheMaTech	Francie
1 <i>H</i> -imidazol-2-karbaldehyd	Fluorochem	Velká Británie
2-methylpropan-2-ol (<i>t</i> -butanol, <i>t</i> BuOH)	Penta	Česká republika
Aceton	Lach-Ner	Česká republika
Acetonitril	Lach-Ner	Česká republika
Argon (99,99%)	Linde	Česká republika
Bromovodík (33 %, w/w) v bezvodé kyselině octové	Acros Organics	USA
Deuterovaná voda	Eurisotop	Velká Británie
Deuterovaný chloroform	Eurisotop	Velká Británie
Diethylether	Lach-Ner	Česká republika
Dichlormethan	Lach-Ner	Česká republika
Di- <i>t</i> -butyl-dikarbonát	Acros Organics	USA
Ethylacetát	Lach-Ner	Česká republika
Hydrogenuhličitan sodný	Lach-Ner	Česká republika
Hydroxid draselný	Lach-Ner	Česká republika
Hydroxid sodný	Lach-Ner	Česká republika
Chlorid měďnatý (dihydrát)	Lach-Ner	Česká republika
Chlorid sodný	Lach-Ner	Česká republika

Chlorid vápenatý (bezvodý)	Lach-Ner	Česká republika
Chlorid zinečnatý (bezvodý)	Lach-Ner	Česká republika
Chloroform	Lach-Ner	Česká republika
Chlorovodíková kyselina (35 %, w/w)	Lach-Ner	Česká republika
Jód	Penta	Česká republika
Methanol	Lach-Ner	Česká republika
Propan-2-ol (isopropyl alkohol, <i>i</i> PrOH)	Lach-Ner	Česká republika
Silikagel (0,035–0,070 mm, 60 Å)	Acros Organics	USA
Síran sodný (bezvodý)	Lach-Ner	Česká republika
Tetrahydridohlinitan lithný	Sigma-Aldrich	USA
Tetrahydrofuran	Penta	Česká republika
Toluen	Lach-Ner	Česká republika
Triethylamin	Lach-Ner	Česká republika
Trifluoroctová kyselina	Honeywell Fluka	USA

4.2 Použité metody a přístroje k charakterizaci připravených látek

4.2.1 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Připravované látky byly analyzovány metodou TLC (z angl. *thin-layer chromatography*) před a po chromatografickém dělení směsí. Tenkovrstvá chromatografie byla prováděna na hliníkových destičkách pokrytých vrstvou adsorbentu (silikagel, tj. amorfni pórovitá forma SiO₂), který představuje stacionární fázi. Mobilní fáze byla zvolena na základě fyzikálně-chemických vlastností separovaných látek. Tyto destičky jsou komerčně dostupné pod názvem TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) a jsou impregnovány fluorescenčním barvivem. K detekci látek, které absorbují nebo zhášejí světlo v dané oblasti UV, byla použita lampa UV (světlo o vlnové délce 254 nm) a následně byla provedena detekce adsorpcí par I₂ v uzavřené prachovnici. Konkrétní expoziční údaje jsou uvedeny v syntetické části v závorce ve formě „(typ adsorbentu; složení mobilní fáze v daném poměru), R_f = retenční faktor dané látky“.

4.2.2 Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Všechna charakterizační NMR spektra byla získána na NMR spektrometerech dostupných na Chemickém ústavu Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy. Spektra ¹H a ¹³C byla měřena na spektrometru BRUKER Ascend 400 o rezonanční frekvenci 400 MHz. Pro měření 1D a 2D spekter při teplotě 25 °C ve standardních NMR kyvetách o průměru 5 mm byly použity standardní pulzní sekvence vybraná z přístrojové knihovny měřících sekvencí. Během měření ¹³C spekter byl zapnutý širokopásmový decoupling ¹H ($\{H^1\}$), tj. odstranění vlivu spin-spinové interakce, která způsobuje vznik multiplétů, které by komplikovaly analýzu dat. Pro přípravu vzorků NMR byla použita čistá deuterovaná rozpouštědla (CDCl₃ nebo D₂O). Spektra byla zpracována v programu MestReNova (Mestrelab Research S.L., Version: 12.0. 1-20560). Jako reference byl v nevodném prostředí používán chemický posun (δ [ppm]) „zbytkového“ CHD₂Cl. Při měření spekter ve vodných roztocích byl do roztoku přidán (\approx 50 μ l do 0,5 ml) jako interní standard *t*-butanol (*t*-BuOH). Chemické posuny atomů se liší v závislosti na hodnotě pH měřeného vodného roztoku, proto nebyla jako reference používána „zbytková“ HDO. Získané hodnoty chemických posunů δ [ppm] jsou uváděny na dvě desetinná místa pro ¹H a na jedno desetinné místo pro ¹³C.

4.2.3 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Charakterizace připravených látek pomocí MS byla provedena na hmotnostním spektrometru Bruker ESQUIRE 3000 s metodou ionizace elektrosprejem (ESI, z angl. *electrospray ionization*) a s použitým analyzátozem iontové pasti (IT, z angl. *ion trap*) v pozitivním módu. Analyzované látky byly rozpuštěny v MeOH či ACN, případně v CDCl₃, či D₂O, a následně byly zředěny do požadované stopové koncentrace pomocí MeOH. Při charakterizaci jednotlivých látek jsou uvedeny pouze intenzivní signály, které se daly jednoznačně přiřadit a interpretovat. Výsledná data jsou uvedena ve tvaru: „ x (y ; [M+H]⁺ či [M+Na]⁺)“, kde x značí experimentálně určené hodnoty m/z , tj. hmotnost/náboj, y značí teoretickou hodnotu m/z uvedenou na jedno desetinné místo, M je označení pro molekulu, která byla analyzována. Měření bylo prováděné Mgr. Ondřejem Zemkem.

4.2.4 Rentgenostrukturní analýza (RTG)

Difrakční data monokrystalu meziprojektu, di-*t*-butyl 7-[(1*H*-imidazol-2-yl)methyl]-1,4,7-triazacyclononan-1,4-dikarboxylátu (**IM3**), byla získána difraktometrem Bruker D8 VENTURE Kappa Duo PHOTON100, který využívá záření Cu-K α ($\lambda = 1,54178 \text{ \AA}$). Měření probíhalo za teploty 150 K (chlazení Cryostrea, Cooler, Oxford Cryosystem). Data byla změřena RNDr. Ivanou Císařovou, CSc. Zpracování dat provedl doc. RNDr. Jan Kotek, Ph.D. v programu SHELXL2014 ([18]).

4.2.5 Elementární analýza (EA)

Elementární analýza byla provedena jako servisní měření na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v Praze na automatickém analyzátoru PERKIN ELMER 2400 II. Obdržené výsledky analýz podílu C : H : N : Cl ve vzorku (průměrné hodnotě ze 2–3 měření) jsou uvedeny v syntetické části jako „naměřená hodnota (teoretická hodnota)“.

4.3 Použité metody a přístroje k analýze acidobazických, koordinačních a spektroskopických vlastností látek

4.3.1 Potenciometrická titrace

Pomocí potenciometrických titrací [19] byly stanoveny protonizační konstanty ligandu (L^{IM}) a konstanty stability jeho komplexů.

Při potenciometrických titracích byly použity chemikálie nejvyšší kvality dostupné z komerčních zdrojů. Pro zamezení absorpce CO_2 v měřeném roztoku byl použit argon (99,99 %). Pro přípravu roztoku byla použita deionizovaná voda. Ligand L^{IM} byl syntetizován, viz *Kapitola 5.1, str. 45*, během této bakalářské práce. Zásobní roztoky potřebné k titracím byly připraveny RNDr. Janou Havlíčkovou dle standardních postupů pro provádění potenciometrických titrací na katedře anorganické chemie PřF UK.

Roztok ligandu o objemu 50 ml a koncentraci $\approx 0,02 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ byl připraven následovně: na analytických vahách bylo naváženo $0,3546 \text{ g } L^{IM} \cdot 2 \text{ H}_2\text{O} \cdot 3 \text{ HCl}$ (ligand L^{IM} ve formě dihydrát trihydrochloridu). Navážka byla kvantitativně převedena do 50ml odměrné baňky. Přesná koncentrace ligandu v tomto zásobním roztoku byla stanovena během výpočtu protonizačních konstant v programu OPIUM ([20], [21]).

Potenciometrické titrace byly prováděny v termostatované cele ($25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$) při konstantní iontové síle $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, která byla definována pomocí chloridu tetramethylamonného [$I(\text{NMe}_4\text{Cl}) = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$]. Měření probíhalo v inertní atmosféře argonu přiváděného nad titrovaný roztok. Rozmezí pH pro titrace bylo $\approx 1,6$ – $12,1$. Rovnovážné napětí článku bylo měřeno kombinovanou skleněnou-argentchloridovou elektrodou (GK 240B) s přesností na 0,1 mV pomocí pH metru (PHM 240) nastaveného na funkci voltmetru. Objemy roztoků (zásobní roztoky připraveného ligandu, HCl, CuCl_2 a ZnCl_2) a deionizované vody, které byly použité k přípravě titrovaného roztoku (o počátečním objemu $\approx 5 \text{ ml}$), byly odměřovány pístovými byretami s mikrometrickými šrouby ($V_{\text{MAX}} = 0,5, 1,0$ nebo $2,5 \text{ ml}$; $\Delta V = 1 \mu\text{l}$). Titrační činidlo, tj. roztok hydroxidu tetramethylamonného (NMe_4OH) o přesně známé koncentraci ($0,22034 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$), bylo přidáváno automatickou byretou o objemu 2 ml (ABU 900) a objem byl odečítán v tisícinách mililitru. Všechny použité přístroje byly dodány firmou Radiometer (Francie).

Před začátkem měření bylo nutné elektrodu několikrát střídavě ponořovat do kyselého ($1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ HCl}$) a bazického ($1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ KOH}$) roztoku. Následně byla

provedena kontrola a příprava aparatury: odstranění bublin vzduchu z hadice automatické byrety; nastavení proudu argonu z tlakové bomby; teplota aparatury na správnou teplotu. Vymytí (2× deionizovaná voda, 2× aceton) a vysušení (za sníženého tlaku vodní vývěvou) měřící nádoby bylo prováděno po každém měření. Po vysušení byly do nádoby pipetovány dané objemy roztoků pomocí pístových byret s mikrometrickým šroubem. Konečná koncentrace ligandu v titrovaných roztocích byla asi přesně $0,004 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Titrace byly prováděny v molárním poměru ion kovu : ligand = 1 : 1 a 1 : 2. K nádobce byla připojena hadička s argonem zhruba 1 cm nad roztok a hadička vedoucí od automatické byrety, jejíž ústí bylo ponořeno pod hladinu titrovaného roztoku těsně nad magnetické míchadlo. Poté byla do roztoku ponořena osušená kombinovaná skleněná elektroda.

Hodnoty rovnovážného napětí článku po jednotlivých přidávacích titračního činidla byly odečítány a zapisovány do počítače automaticky počítačovým programem z balíku OPIUM. Automatické titrace byly naprogramované na základě dat z titrace prováděné ručně. Dle této ruční titrace byl nastaven dávkovací soubor pro řídicí program titrací, který obsahoval příkazy určující objem přidávaného titračního činidla, dobu mezi přidávkem a odečtením hodnoty rovnovážného napětí a dobu ukončení titrace. Během automatických titrací byly vynechávány oblasti v blízkosti bodu ekvivalence. Důvodem vynechání těchto oblastí byla jejich příliš velká relativní chyba v určení rovnovážného napětí článku. Celková doba vlastní titrace se pohybovala kolem 40–50 minut, kalibrace mezi jednotlivými měřeními trvaly 25–35 minut.

Každá sada dat sestávala minimálně ze tří statisticky shodných vlastních titrací. Počet bodů titračního měření byl 40–80 v závislosti na průběhu titračních křivky, a tedy na nastavení jednotlivých titrací dle dávkovacího souboru. Naměřené hodnoty sloužily jako zdrojová data pro program OPIUM, kterým byly získány protonizační konstanty ligandu a konstanty stability systému ligand : kation kovu. Program prokládá experimentálně naměřené hodnoty funkcí nelineární regrese metodou nejmenších čtverců. Jelikož jsou kalibrační parametry elektrody časově proměnné, tak před i po každé titraci byla provedena kalibrace elektrodového systému titrací, kterou byly zjištěny parametry kombinované elektrody dle rovnice (16):

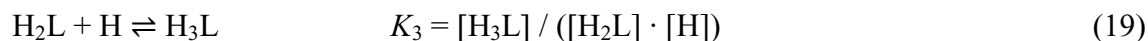
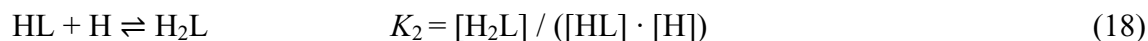
$$E = E_{\text{rov}}^0 + S \cdot \log[\text{H}^+] + J_A \cdot [\text{H}^+] + J_B \cdot K_w / [\text{H}^+] \quad (16)$$

kde E je rovnovážné napětí článku (V), E_{rov}^0 je standardní rovnovážné napětí článku (dáno rozdílem standardních redoxních potenciálů elektrod) (V), S je tzv. Nernstova směrnice, koeficienty J_A a J_B popisují kyselou a bazickou chybu indikační skleněné elektrody a K_w je iontový součin vody. Pro záporný dekadický logaritmus iontového součinu vody byla jako fixní hodnota dosazena $\text{p}K_w = 13,81$ (iontová síla $I(\text{NMe}_4\text{Cl}) = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$), která byla převzata z literatury [19].

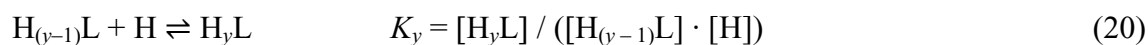
Z titrací byly pomocí programu OPIUM určeny protonizační konstanty ligandu (\mathbf{L}^{IM}), jejichž znalost je podmínkou pro výpočet konstant stability komplexů, které byly též získány pomocí programu OPIUM. Tato podmínka platí pro ligandy, které mají povahu kyselin či bází⁸, viz rovnice (17–21).

ROVNICE (17–19) popisují postupnou protonizaci ligandu chemickými rovnicemi a matematickými vztahy definují postupné (konsekutivní) protonizační konstanty ligandu (obecně K_y). **ROVNICE (20)** definuje K_y a **ROVNICE (21)** definuje celkové protonizační konstanty ligandu (β_y) [19]:

Postupná protonizace ligandu (L)



Obecně:



Celkové protonizační konstanty ligandu (β_y):

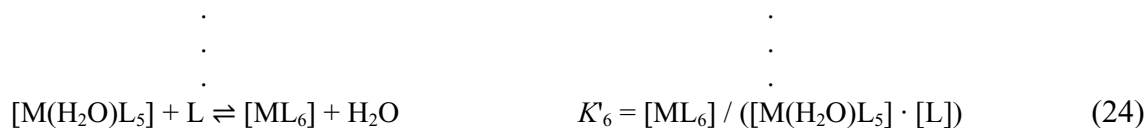


Komplexy vznikají dle rovnic (22–24), *str.* 43. Je-li ve vodném roztoku ion kovu (M), bude hydratován (tzn., že se na něj koordinují molekuly vody). Po přidání

⁸ Hranaté závorky v rovnicích označují komplexní sloučeniny, hranaté závorky ve vztazích pro konstanty stability a protonizační konstanty znázorňují relativní molární koncentrace částic v rovnováze. Předpokladem je, že aktivitní koeficient i -té složky je jednotkový, a proto lze aktivitu i -té složky ztotožnit s relativní molární koncentrací. Pro názornost nejsou uvedeny náboje jednotlivých částic v chemických rovnicích i v matematických vztazích.

ligandu (L) dojde k substituci molekul vody za L. Postupnou substituci lze vyjádřit následujícími chemickými rovnicemi (22–24), jejichž rovnováhy popisují postupné (konsekutivní) konstanty stability komplexů (K'_x). Celková rovnovážná konstanta stability komplexu (β'_x) je dána součinem postupných konstant stability [22].

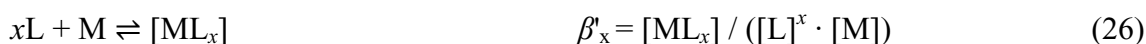
ROVNICE (22–24) popisují vznik komplexů chemickými rovnicemi a matematickými vztahy definují postupné rovnovážné konstanty stability komplexů (obecně K'_x). **ROVNICE (25)** definuje K'_x a **ROVNICE (26)** definuje celkové rovnovážné konstanty stability ligandu (β'_x) [22]:



Obecně:



Celková rovnovážná konstanta stability komplexu (β'_x):



Obecný vztah mezi postupnou protonizační konstantou (K_y) a celkovou protonizační konstantou (β_y), stejně jako vztah mezi postupnou konstantou stability (K'_x) a celkovou rovnovážnou konstantou stability (β'_x), je definován následovně (27) a (28):

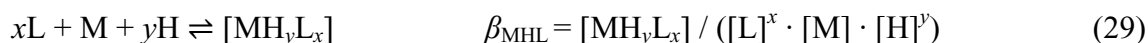
OBEČNÝ VZTAH pro výpočet postupných protonizačních konstant ligandu (27) a postupných rovnovážných konstant stabilit komplexu (28) [19]:

$$\log K_y = \log \beta_y - \log \beta_{(y-1)} \quad (27)$$

$$\log K'_x = \log \beta'_x - \log \beta'_{(x-1)} \quad (28)$$

U polydentálních⁹ ligandů i po jejich úplné koordinaci na centrální ion kovu mohou být některá jejich koordinační místa stále obsazena molekulami vody. Naopak, některé nekoordinované atomy ligandu mohou zůstat protonizované. Mohou tedy existovat i další typy komplexů, např. protonizované komplexy, viz rovnice (29), které jsou obvykle přítomny v roztocích o nízkém pH.

ROVNICE (29) popisuje vznik protonizovaného komplexu chemickou rovnicí a matematickým vztahem definuje celkové konstanty protonizovaných komplexů (β_{MHL}), které jsou obdobné celkové rovnovážné konstantě stability komplexu β^x , ale berou v úvahu možnou protonizaci komplexu [19].



Na základě všech rovnovážných konstant pro daný systém lze sestavit tzv. distribuční diagramy, které znázorňují procentuální zastoupení různých částic ligandu nebo komplexních částic v závislosti na pH a složení roztoku.

Statistické vyhodnocení a zpracování naměřených dat byla prováděna pod vedením RNDr. Jana Havlíčkové v programu OPIUM.

4.3.2 UV/Vis spektrofotometrie

Absorpční spektra byla měřena na spektrofotometru Specord 50 Plus (Analytic Jena) v kyvetách s optickou dráhou 10 mm při teplotě 25 °C v rozmezí vlnových délek od 200 do 900 nm a v kyvetách s optickou dráhou 1 mm při teplotě 25 °C v rozmezí vlnových délek 230 do 400 nm. Před vlastním měřením vzorků byl změřen referenční vzorek, v tomto případě kyveta obsahující deionizovanou vodu.

Vzorky pro měření spekter UV-Vis byly připraveny stejně jako vzorky pro potenciometrické titrace. Tzn., byl připraven výchozí roztok o stejných koncentracích reaktantů jako pro potenciometrické titrace a do tohoto roztoku bylo přidáno automatickou pipetou takové (na základě potenciometrických titrací) množství roztoku NMe₄OH, aby bylo dosaženo požadovaného pH ($\approx 10,0$ a $\approx 6,5$). Hodnota pH byla poté zkontrolována pomocí kalibrované kombinované skleněné elektrody. Výsledné pH vzorků bylo 10,10 a 6,52.

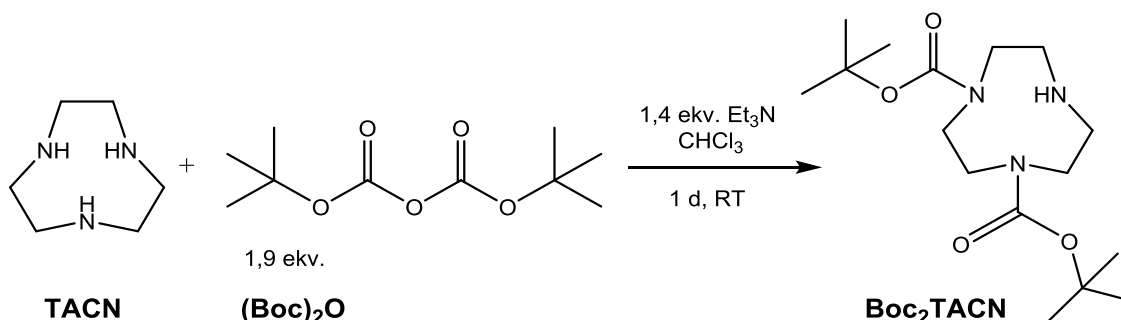
⁹ Polydentální ligandy, tzv. cheláty, jsou takové ligandy, které jsou schopny koordinovat centrální ion kovu více donorovými atomy.

5 Výsledky

5.1 Výsledky syntéz a charakterizace meziproduktů a cílené látky L^{IM}

Následujícími syntetickými kroky byl připraven makrocyclický ligand L^{IM} . Charakterizace výsledného ligandu a připravených meziproduktů byly provedeny metodami popsanými v *Kapitole 4.2, str. 38*.

5.1.1 Syntéza látky Boc_2TACN



Obr. 14: Schéma syntézy di-*t*-butyl 1,4,7-triazacyklononan-1,4-dikarboxylátu (Boc_2TACN). K vytvoření schématu byl použit program ChemDraw Professional 16.0 (PerkinElmer Informatics, Inc., Level Professional, Version 16.0.1.4).

Syntéza di-*t*-butyl 1,4,7-triazacyklononan-1,4-dikarboxylátu (Boc_2TACN) dle zdroje [23] byla optimalizována, viz *Obr. 14*. 1,00 g (7,7 mmol) 1,4,7-triazacyklononanu (TACN) byl rozpuštěn v 100 ml CHCl_3 v 250ml kulaté zábrusové baňce. Do baňky bylo přidáno 1,5 ml (10,8 mmol; 1,4 ekv.) triethylaminu (= Et_3N). Během míchání roztoku magnetickým míchadlem na magnetické míchačce byl připraven roztok reakčního činidla, tj. navážka 3,13 g (14,3 mmol; 1,9 ekv.) di-*t*-butyl-dikarbonátu ($(\text{Boc})_2\text{O}$) byla rozpuštěna v 50 ml CHCl_3 . Roztok $(\text{Boc})_2\text{O}$ v CHCl_3 byl přikapáván do reakční směsi přikapávací nálevkou zhruba 20 minut, během této doby se roztok reakční směsi bělavě zakalil. Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu jednoho dne.

Následující den byly rozpouštědlo a Et_3N z reakční směsi odpařeny na rotační vakuové odparce (RVO) za vzniku viskózní bělavě zakalené kapaliny. Čistý Boc_2TACN byl izolován z odparku nízkotlakou sloupcovou (kolonovou) chromatografií. Do kolony o rozměrech 4 × 20 cm bylo nalito 170 ml silikagelu, tj. silikagel v mobilní fázi. Zjištěný mrtvý objem kolony (V_M) byl 75 ml. Odparek byl

nanesen na stacionární fázi (rozpuštěn v malém množství mobilní fáze) a byl eluován mobilní fází o složení EtOAc : MeOH = 5 : 1. Frakce byly odebírány po 50 ml do plastových zkumavek. Látka **Boc₂TACN** dle TLC (SiO₂; EtOAc : MeOH = 5 : 1; R_f = 0,34) byla přítomna ve frakcích 4–9 (celkem 6 frakcí). Frakce byly slity do 500ml kulaté zábrusové baňky a rozpouštědla mobilní fáze byla odpařena na RVO. Látka **Boc₂TACN** byla získána ve formě bělavě zakalené viskózní kapaliny (1,49 g; 58 %).

Charakterizace látky **Boc₂TACN**:

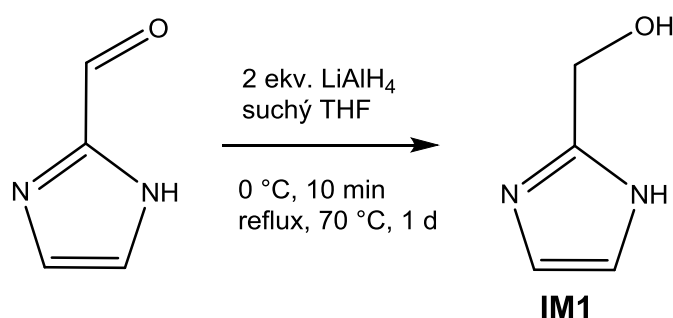
TLC: (SiO₂; EtOAc : MeOH = 5 : 1), R_f = 0,34

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 1,41 (s, 18H, (CH₃)₃-C); 2,81–2,94 (m, 4H, makrocyklus); 3,12–3,27 (m, 4H, makrocyklus); 3,31–3,47 (m, 4H, makrocyklus)

¹³C{¹H} NMR (400 MHz, CDCl₃): 28,5; 47,3; 47,7; 48,0; 48,2; 49,5; 49,8; 50,4; 51,5; 52,2; 52,4; 53,0; 79,7; 79,8; 79,8; 2× 155,7; 156,0

MS(+): 330,4 (330, 2; [M+H]⁺); 352,3 (352,2; [M+Na]⁺)

5.1.2 Syntéza látky **IM1**



Obr. 15: Schéma syntézy 2-hydroxy-methyl-1H-imidazolu (**IM1**). K vytvoření schématu byl použit program ChemDraw Professional 16.0 (PerkinElmer Informatics, Inc., Level Professional, Version 16.0.1.4).

Syntéza 2-hydroxy-methyl-1H-imidazolu (**IM1**) dle zdroje [24] byla optimalizována, viz *Obr. 15*. Do 250mL kulaté zábrusové baňky bylo do 100 ml bezvodého THF přidáno 0,80 g (21,1 mmol; 2 ekv.) LiAlH₄. Za stálého míchání magnetickým míchadlem na magnetické míchače byla baňka se suspenzí umístěna do ledové lázně zhruba na 10 minut. Následně byl do směsi přidán 1,00 g (10,4 mmol) 1H-imidazol-2-karbaldehydu. Reakční směs byla ponechána v ledové lázni ještě následujících 10 minut a poté byla zahřívána jeden den v olejové lázni pod zpětným chladičem (reflux) při teplotě 70 °C.

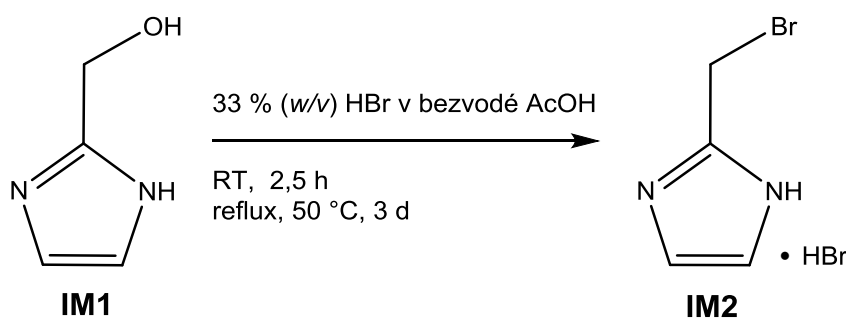
Následující den byla reakční směs umístěna opět do ledové lázně, kde byla zchlazena. Injekční stříkačkou byla opatrně přidána směs vody a THF (smísení 4 ml deionizované vody a 20 ml THF) a 12 ml 5 % (w/v) vodného roztoku NaOH. Tímto způsobem bylo zklividováno nadbytečné množství nedoreagovaného LiAlH₄. Reakční směs byla ponechána v ledové lázni dalších 15 minut, během které se z šedé barvy (způsobené dispergovanými částicemi Al) odbarvila do žlutooranžového roztoku s bíložlutou sraženinou. Směs byla přefiltrována přes fritu o hrubosti S3. Filtrát byl zahuštěn na RVO. K odparku ve formě žlutooranžového oleje bylo přidáno cca 30 ml toluenu a ten byl znovu odpařen na RVO, odpaření z toluenu bylo provedeno dohromady dvakrát (slouží k odstranění vody azeotropickou destilací). Byl získán žlutavý olej obsahující látku **IM1** (0,75 g; 74 %).

Charakterizace látky **IM1**:

¹H NMR (400, MHz, MeOH-*d*₄): odpovídá publikovaným datům z literatury [24]

MS(+): 99,2 (99,1; [M+H]⁺); 121,1 (121,0; [M+Na]⁺)

5.1.3 Syntéza látky **IM2**



Obr. 16: Schéma syntézy 2-(bromomethyl)-1H-imidazolu (**IM2**). K vytvoření schématu byl použit program ChemDraw Professional 16.0 (PerkinElmer Informatics, Inc., Level Professional, Version 16.0.1.4).

Syntéza 2-(bromomethyl)-1H-imidazolu (**IM2**) dle zdroje [24] byla optimalizována, viz *Obr. 16*. 1,29 g (13,2 mmol) látky **IM1** bylo rozpuštěno v 150 ml 33 % (w/w) roztoku HBr v bezvodé AcOH. Směs byla míchána magnetickým míchadlem při RT po dobu 2,5 hodin v kulaté 250ml baňce se zábrusem, která byla utěsněna namazaným skleněným špuntem. Poté byl špunt vyměněn za zpětný chladič, jehož zábrus byl taktéž namazán, aby bylo zajištěno co nejlepší těsnění. Reakční směs byla míchána a zahřívána v olejové lázni pod zpětným chladičem na teplotu 50 °C po dobu tří dnů.

Rozpouštědla byla odpařena na suché RVO (vodní lázeň: $t = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$). K odparku ve formě žlutohnědého oleje bylo přidáno cca 30 ml toluenu a ten byl znovu odpařen na RVO za vzniku oranžovohnědé amorfni pevné látky. Přidání a odpaření z toluenu bylo provedeno celkem třikrát. Pevný odparek byl triturován v cca 50 ml vroucího THF nad horkovzdušnou pistolí, THF nad pevnou látkou byl poté opatrně odebrán Pasteurovou pipetou. Triturace v THF byla provedena dohromady dvakrát. Po mírném ochlazení na RT byla látka při třetím přidání THF ještě triturována za použití ultrazvuku.

Produkt **IM2** byl odsát na fritě o hrubosti S4 a byl sušen promytím s Et₂O (3 × 30 ml) a prosáváním vzduchem, na dosušení byl umístěn na Petriho misce do sušárny ($t = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$) na 15 minut. Celkově bylo získáno 2,66 g (84 %) hydrobromidu látky **IM2** (**IM2** · HBr, $M_r = 241,91$) ve formě oranžovohnědého prášku.

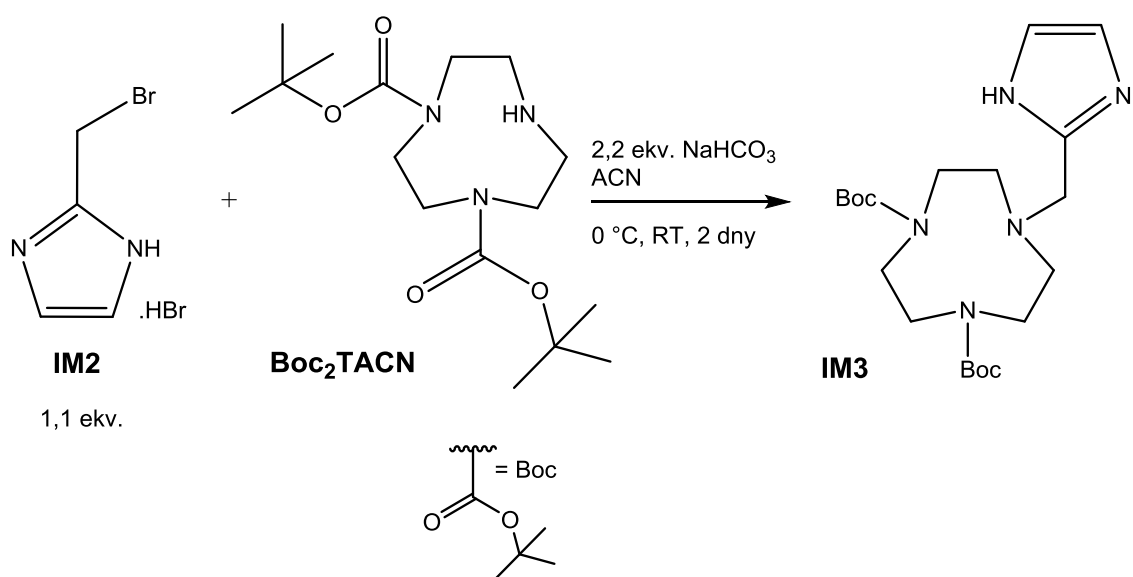
Charakterizace látky **IM2** ve formě hydrobromidu:

TLC: (SiO₂; *i*PrOH), $R_f = 0,52$

¹H NMR (400 MHz, MeOH-*d*₄): odpovídá publikovaným datům z literatury [24]

MS(+): 161,1 (161,0; [M+H]⁺)

5.1.4 Syntéza látky **IM3**



Obr. 17: Schéma syntézy di-*t*-butyl 7-[(1*H*-imidazol-2-yl)methyl]-1,4,7-triazacyclononan-1,4-dikarboxylátu (**IM3**). K vytvoření schématu byl použit program ChemDraw Professional 16.0 (PerkinElmer Informatics, Inc., Level Professional, Version 16.0.1.4).

Pro přípravu di-*t*-butyl 7-[(1*H*-imidazol-2-yl)methyl]-1,4,7-triazacyclononan-1,4-dikarboxylátu (**IM3**) (dle schématu viz *Obr. 17, str. 48*) bylo 1,37 g (4,2 mmol) **Boc₂TACN** rozpuštěno v 150 ml ACN. Pomocí ultrazvuku bylo dále v tomto roztoku rozpuštěno 1,10 g (4,6 mmol; 1,1 ekv.) hydrobromidu látky **IM2**. Reakční směs byla míchána magnetickým míchadlem v 250ml kulaté zábrusové baňce, která byla umístěna do ledové lázně na magnetickou míchačku. K reakční směsi bylo přidáno 0,76 g (9,1 mmol; 2,2 ekv.) NaHCO₃. Reakční směs v baňce opatřené sušicí trubičkou s bezvodým CaCl₂ byla ponechána v ledové lázni (led se během následujících hodin rozpustil) a míchána dva dny.

Nerozpuštěné soli byly odstraněny na fritě o hrubosti S4. Filtrát byl zahuštěn na RVO za vzniku žluté pěny. Odparek byl rozpuštěn v 50 ml DCM a byl promyt 5 % (w/v) vodným roztokem NaOH (3 × 30 ml) a jednou nasyceným vodným roztokem NaCl (1 × 30 ml). Organická fáze byla sušena bezvodým Na₂SO₄, který byl odfiltrován fritou o hrubosti S2, a zahuštěna na RVO do žlutého oleje o hmotnosti 1,58 g, který během jednoho dne ztuhnul.

Tato reakce byla provedena znova s těmito množstvími: 1,49 g (4,5 mmol) **Boc₂TACN**, 1,20 g (5,0 mmol; 1,1 ekv.) látky **IM2** ve formě hydrobromidu, 0,84 g (10,0 mmol; 2,2 ekv.) NaHCO₃. Odparek, tj. žlutý olej, který měl tendenci tuhnout, měl hmotnost 1,68 g.

První odparek byl rozpuštěn v DCM, roztok byl přelit k druhému odparku a byl na RVO zahuštěn na odparek o hmotnosti 3,26 g. Látka **IM3** byla poté čištěna nízkotlakou kolonovou chromatografií. Jako stacionární fáze byl použit silikagel (SiO₂) a jako mobilní fáze byla zvolena směs DCM : *i*PrOH = 5 : 1. Do kolony o rozměrech 4 × 30 cm bylo nalito 250 ml silikagelu, tj. silikagel v mobilní fázi. Zjištěný mrtvý objem kolony (V_M) byl 110 ml. Spojené odparky byly nanášeny na kolonu v malém množství mobilní fáze. Frakce byly odebírány po 25–30 ml do 50ml plastových zkumavek. Čistá látka **IM3** byla dle TLC (SiO₂; *i*PrOH; $R_f = 0,82$) přítomna ve frakcích 4–7 (celkem 4 frakce). Frakce byly slity do 250ml kulaté baňky a rozpouštědla mobilní fáze byla odpařena na RVO. Látka **IM3** byla získána ve formě žlutého oleje, který během 7 dnů začal krystalovat (2,82 g; 79 %). Výtěžek byl počítán na výchozí množství látky **IM2** · HBr použité v obou reakcích.

Charakterizace látky IM3:

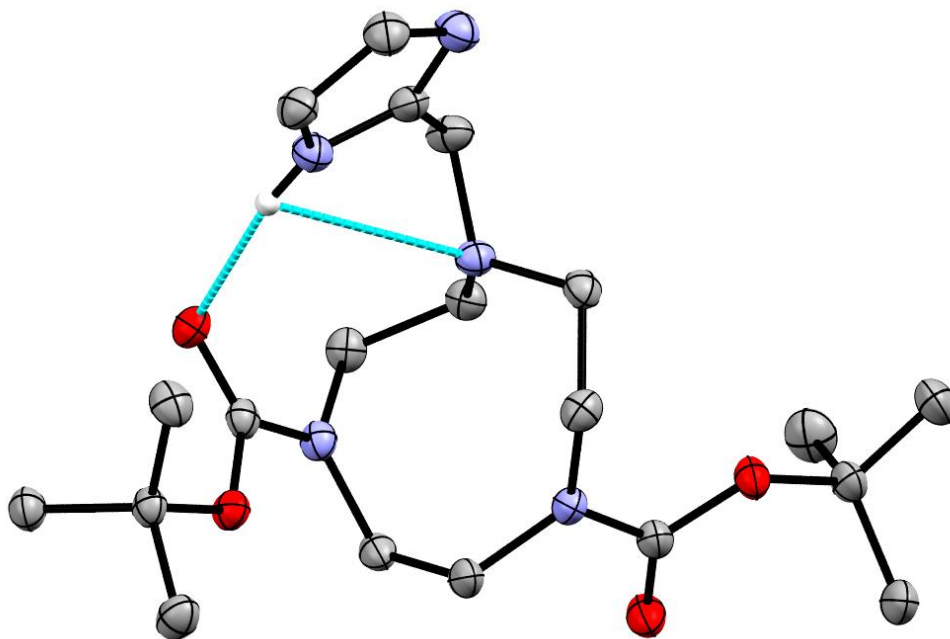
TLC: (SiO₂; *i*PrOH), *R_f* = 0,82

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1,38–1,54 (m, 18H, (CH₃)₃-C); 1,89–2,33 (brs, 2H, makrocyklus); 2,54–2,74 (m, 4H, makrocyklus); 2,83–3,05 (brs, 1H, C-NH); 3,09–3,55 (m, 6H, makrocyklus); 3,67 (s, 2H, N-CH-CH-N); 6,86 (s, 2H, N-CH₂-C)

¹³C{¹H}-NMR (400 MHz, CDCl₃): 28,6; 28,7; 28,8; 47,5; 48,9; 50,5; 51,4; 51,9; 52,9; 54,5; 54,7; 54,8; 55,6; 80,1; 80,2; 80,3; 147,8; 147,9; 155,8; 156,4; 157,8

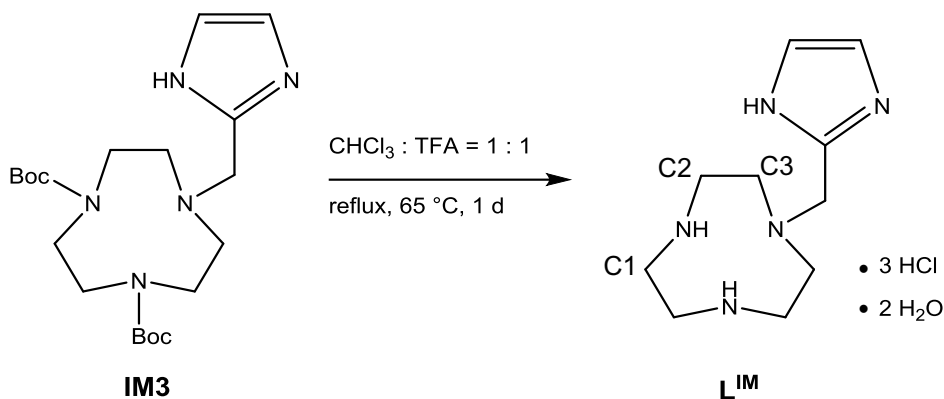
MS(+): 410,4 (410,3; [M+H]⁺)

Struktura látky IM3 v pevném stavu byla stanovena rentgenostrukturní analýzou, viz Obr. 18. Monokrystal látky IM3 byl získán odpařením mobilní fáze, tj. směsi DCM : *i*PrOH = 5 : 1, ze slitých frakcí po chromatografickém dělení.



Obr. 18: Struktura di-*t*-butyl 7-[(1*H*-imidazol-2-yl)methyl]-1,4,7-triazacyclononan-1,4-dikarboxylátu (IM3) v pevném stavu. Barevné značení atomů: N bledě modře, O červeně, C šedě; bílou barvou je znázorněn atom vodíku vázaný na atom dusíku a další atomy vodíků jsou z důvodu lepší přehlednosti vynechány. Tyrkysově jsou znázorněny intramolekulární vodíkové vazby. Černě jsou znázorněny kovalentní vazby mezi atomy. Obrázek byl získán od doc., RNDr. Jana Kotka, Ph.D.

5.1.5 Syntéza ligandu L^{IM}



Obr. 19: Schéma syntézy ligandu, 1-[(1*H*-imidazol-2-yl)methyl]-1,4,7-triazacyclononanu (L^{IM}). Označení C1, C2 a C3 bylo zvoleno z důvodu rozlišení atomů uhlíků (uvedeno v charakterizaci látky L^{IM} , str. 49). K vytvoření schématu byl použit program ChemDraw Professional 16.0 (PerkinElmer Informatics, Inc., Level Professional, Version 16.0.1.4).

Ligand 1-[(1*H*-imidazol-2-yl)methyl]-1,4,7-triazacyclononan (L^{IM}) byl připraven dle schématu (Obr. 19) následovně. 5,37 g (13,1 mmol) látky **IM3** bylo rozpuštěno v 170 ml směsi $\text{CHCl}_3 : \text{TFA} = 1 : 1$ (v/v) v 500ml kulaté zábrusové baňce. Reakční směs byla míchána a zahřívána v olejové lázni pod zpětným chladičem na teplotu 65 °C po dobu jednoho dne.

Následující den byla rozpouštědla odpařena na RVO. K odparku bylo přidáno cca 30 ml toluenu a ten byl znovu odpařen na RVO. Odpaření z toluenu bylo provedeno celkem dvakrát. K odparku bylo přidáno 20 ml koncentrované vodné HCl (35 %, w/w) a ta byla odpařena na RVO. K odparku bylo přidáno 50 ml EtOH a pomocí ultrazvuku byl produkt triturován. Vzniklý krystalický produkt L^{IM} byl odfiltrován na fritě o hrubosti S4 a byl sušen promytím cca 30 ml acetonu a poté Et_2O (3 × 30 ml) a prosáváním vzduchem.

Látka L^{IM} byla rekrystalizována z MeOH. Do 250ml kulaté zábrusové baňky bylo k produktu ve formě bílého prášku o hmotnosti 4,29 g přidáno zhruba 80 ml MeOH. Vzniklá suspenze byla přivedena k varu horkovzdušnou pistolí a byla vařena zhruba pět minut, až se látka rozpustila. Následně byla směs zchlazena na RT a umístěna na tři dny do lednice, kde ligand L^{IM} vykrytalizoval.

Produkt L^{IM} byl zfiltrován na fritě o hrubosti S4, byl promyt studeným MeOH a sušen promytím Et_2O (3 × 30 ml) a prosáváním vzduchem. Celkově bylo získáno 3,45 g (74 %) látky L^{IM} ve formě bílého prášku (EA a potenciometrickou titrací bylo dokázáno, že L^{IM} byla získána ve formě $L^{IM} \cdot 2\text{H}_2\text{O} \cdot 3\text{HCl}$, $M_r = 354,67$).

Charakterizace látky L^{IM} :

TLC: (SiO₂; EtOH : konc. vodný NH₃ = 1 : 1), $R_f = 0,26$

¹H NMR (400 MHz, D₂O, pD = 3,71): 3,06–3,12 (m, 4H, C3); 3,40–3,46 (m, 4H, C2); 3,72 (s, 4H, C1); 4,28 (s, 2H, N–CH₂–C); 7,50 (s, 2H, N–CH–CH–N)

¹³C{¹H} NMR (400 MHz, D₂O, pD = 3,71): 43,1 (C1); 44,3 (C2); 48,2 (C3); 48,4 (N–CH₂–C); 120,3 (N–CH–CH–N); 142,0 (CH₂–C–N)

MS(+): 210,2 (210,2; [M+H]⁺)

EA ($L^{IM} \cdot 2H_2O \cdot 3HCl$): C 33,79 (33,86), H 7,02 (7,39), N 19,39 (19,74), Cl 30,07 (29,98)

5.2 Potenciometrické titrace

Potenciometrickými titracemi byly stanoveny celkové protonizační konstanty ligandu L^{IM} , které jsou uvedeny v Tab. 2, a celkové rovnovážné konstanty stability měďnatého a zinečnatého komplexu, které jsou uvedeny v Tab. 3. Tyto hodnoty byly získány programem OPIUM z experimentálních dat naměřených potenciometrickými titracemi.

Tab. 2: Hodnoty celkových protonizačních konstant ligandu L^{IM} (β_y). Podmínky titrace: $c_L = 4 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, kde c_L je molární koncentrace ligandu L^{IM} ; $I = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NMe₄Cl; 25 °C. V uvedených chemických rovnicích nejsou uvedeny náboje. Standardní směrodatné odchylky jsou uvedeny v závorce.

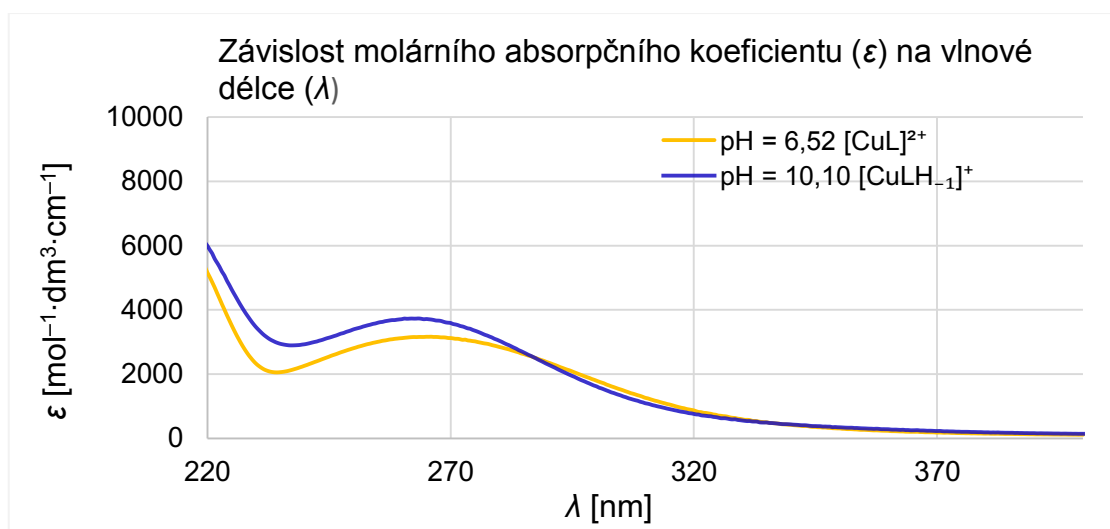
Rovnováha	log β_y
$L + H \rightleftharpoons HL$	10,624(6)
$L + 2 H \rightleftharpoons H_2L$	17,27(1)
$L + 3 H \rightleftharpoons H_3L$	22,18(1)

Tab. 3: Hodnoty celkových rovnovážných konstant stability komplexu (β'_x). Podmínky titrace: $c_L = c_M = 4 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, kde c_L je molární koncentrace ligandu L^{IM} a c_M je molární koncentrace ionu kovu (Cu²⁺ nebo Zn²⁺); $I = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NMe₄Cl, 25 °C. Standardní směrodatné odchylky jsou uvedeny v závorce.

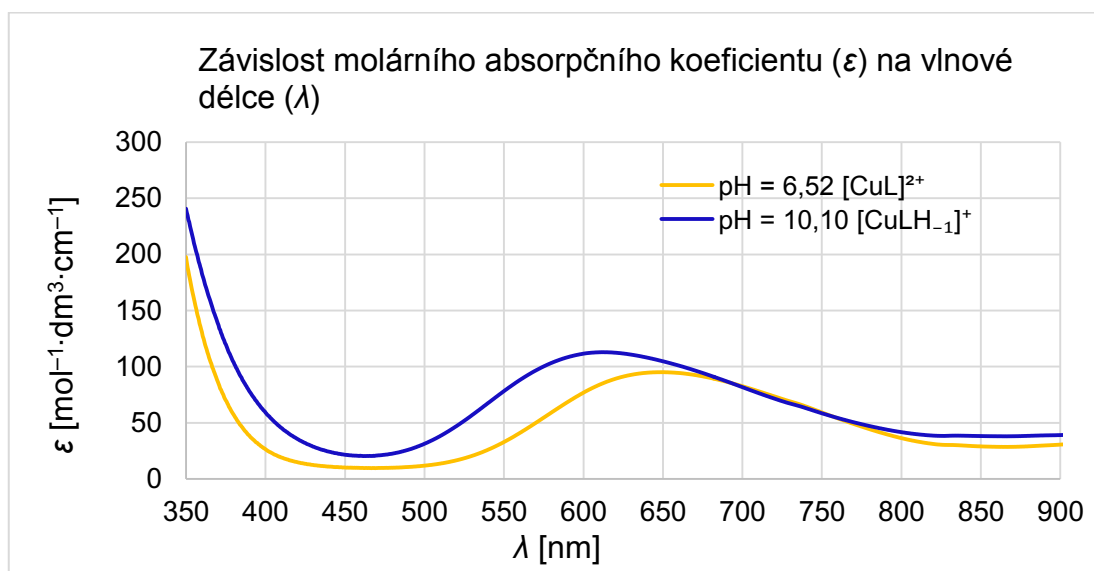
Komplexní částice	Cu ²⁺	Zn ²⁺
	log β'_x	log β'_x
[ML] ²⁺	19,037(7)	13,754(2)
[MLH ₋₁] ⁺	10,16(2)	3,711(6)
[MLH ₋₂]	-1,12(2)	-7,674(6)

5.3 UV/Vis spektrofotometrie

Byla naměřena UV/Vis spektra, viz *Obr. 20* a *Obr. 21*, měďnatého komplexu v roztocích o různém pH. Příprava a složení vzorků i postup měření je popsán v *Kapitole 4.3.2, str. 44*. V *Tab. 4, str. 54* jsou uvedeny hodnoty maxim absorpčních pásů v oblastech UV a Vis pro komplexní částice $[\text{CuL}]^{2+}$ a $[\text{CuLH}_{-1}]^{+}$.



Obr. 20: Elektronová absorpční spektra v systému $\text{Cu}^{2+} : \text{L}^{\text{IM}} = 1 : 1$ v rozmezí 220–400 nm měřená v roztocích o $c_{\text{L}} = c_{\text{M}} = 4 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, kde c_{L} je molární koncentrace ligandu L^{IM} a c_{M} je molární koncentrace Cu^{2+} . Žlutá křivka ukazuje spektrum při pH = 6,52; modrá křivka ukazuje spektrum při pH = 10,10.



Obr. 21: Elektronová absorpční spektra v systému $\text{Cu}^{2+} : \text{L}^{\text{IM}} = 1 : 1$ v rozmezí 350–900 nm měřená v roztocích o $c_{\text{L}} = c_{\text{M}} = 4 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, kde c_{L} je molární koncentrace ligandu L^{IM} a c_{M} je molární koncentrace Cu^{2+} . Žlutá křivka ukazuje spektrum při pH = 6,52; modrá křivka ukazuje spektrum při pH = 10,10.

Tab. 4: Tabulka hodnot maxim absorpčních pásů pro komplexní částice $[\text{CuL}]^{2+}$ a $[\text{CuLH}_1]^+$.

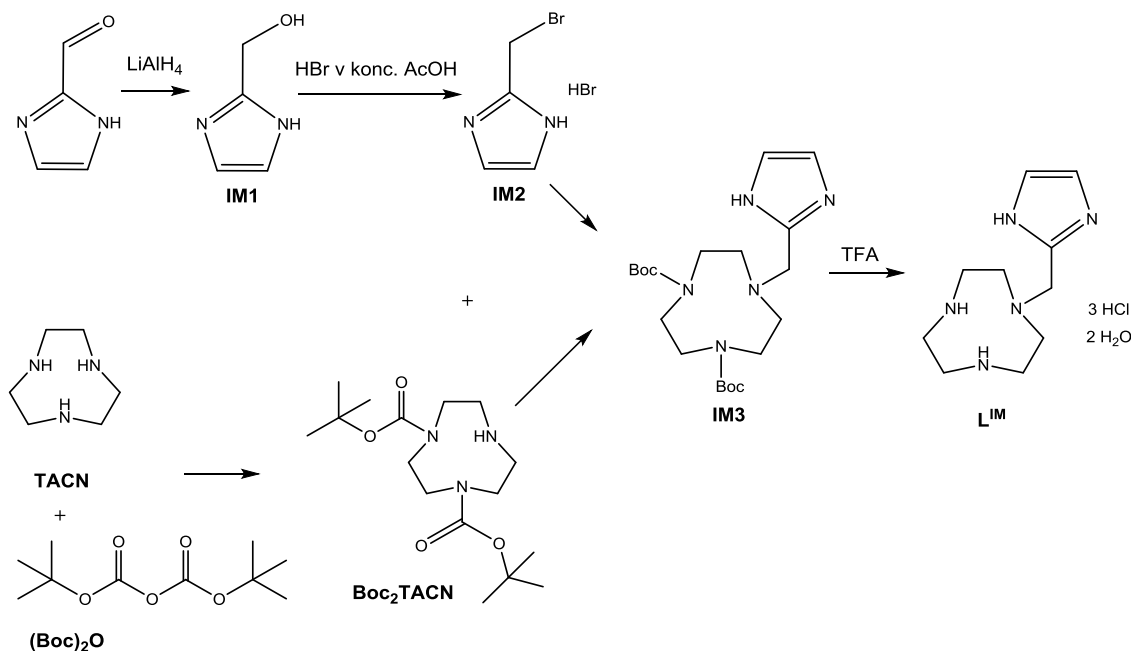
Komplexní částice	Maxima absorpčních pásů	
	λ [nm]	ϵ_{max} [$\text{mol}^{-1}\cdot\text{dm}^3\cdot\text{cm}^{-1}$]
$[\text{CuL}]^{2+}$	266	3164
	650	95
$[\text{CuLH}_1]^+$	264	3732
	612	113

6 Diskuze

6.1 Syntéza

Prvním zkoušeným syntetickým návrhem k přípravě látky L^{IM} byla redukční aminace 1*H*-imidazol-2-karboxaldehydu s TACN pomocí tetrahydridoboritanu sodného na základě publikované přípravy tris-{1-[(1*H*-imidazol-2-yl)methyl]}-1,4,7-triazacyklononanu. Byly však testovány i redukční činidla triacetoxyborohydrid sodný či kyanoborohydrid sodný [25]. Další testovanou možností byla hydroxymethylace paraformaldehydem

N-chráněného imidazolu (chránicí skupiny: *t*-butyloxy-karbonyl = Boc, benzyloxy-karbonyl, ethyloxy-karbonyl,), následovaná bromací chráněného 2-hydroxy-methyl-1*H*-imidazolu za vzniku alkylačního činidla, které by reagovalo s Boc_2TACN za vzniku chráněné látky **IM3**. Všechny chránicí skupiny by byly odstraněny v kyselém či bazickém prostředí dle charakteru chránicí skupiny za vzniku látky L^{IM} . Přes poměrně značné úsilí nebyly tyto syntetické cesty úspěšné, a proto byla zvolena syntetická cesta popsaná v *Kapitole 5.1, str. 45*. Celkové reakční schéma, bez reakčních podmínek, je uvedeno na *Obr. 22*.



Obr. 22: Syntéza makrocyklického ligandu L^{IM} . K vytvoření schématu byl použit program ChemDraw Professional 16.0 (PerkinElmer Informatics, Inc., Level Professional, Version 16.0.1.4).

Nejdříve byl připraven chráněný 1,4,7-triazacyklononan (**Boc₂TACN**), aby bylo zamezeno vzniku vedlejších produktů během alkylační reakce. 1*H*-imidazol-2-karbaldehyd byl redukován a dále převeden na bromid, 2-(bromomethyl)-1*H*-imidazol (**IM2**). Připravené alkylační činidlo (**IM2**) reagovalo s **Boc₂TACN** za vzniku látky **IM3** v relativně vysokém výtěžku (79 %). Kysele katalyzované odstranění chránicích skupin (Boc) na **IM3** vedlo ke vzniku finálního makrocyclického ligandu **L^{IM}**, která byl získán ve formě dihydrátu trihydrochloridu. Výtěžky jednotlivých kroků syntézy se pohybovaly v rozmezí zhruba od 70–80 %.

Zvýšení výtěžku redukce 1*H*-imidazol-2-karbaldehyd pomocí LiAlH₄ na 2-hydroxy-methyl-1*H*-imidazol lze dosáhnou odstředěním a promýváním suspenze vzniklého Al(OH)₃, na kterém je pravděpodobně alkohol **IM1** částečně adsorbován. Hydroxid hlinitý odstraněný filtrací byl redispersován v deionizované vodě a směs byla poté 2× centrifugována (vždy 15 min, 3000 RPM) na centrifuze (Nüve, Product: Bench-Top Centrifuge, Type: NF 800, fixed angle rotor). Supernatanty byly opatrně odebrány Pasterovou pipetou do baňky a voda byla odpařena na RVO. ¹H NMR spektrum malého množství odparku bylo totožné s naměřeným spektrem látky **IM1**. Pokud ale byla tato reakce prováděna s větším množstvím výchozí látky (2 g 1*H*-imidazol-2-karbaldehydu) a čtyřmi ekvivalenty redukčního činidla (2× tolik od popsané reakce v *Kapitole 5.1.2, str. 46*, stupeň konverze byl podstatně nižší (výtěžek ≈ 40 %). Proto byla reakce prováděna v menším množství (1 g 1*H*-imidazol-2-karbaldehydu) s obdobnými výtěžky jako v postupu popsaném výše.

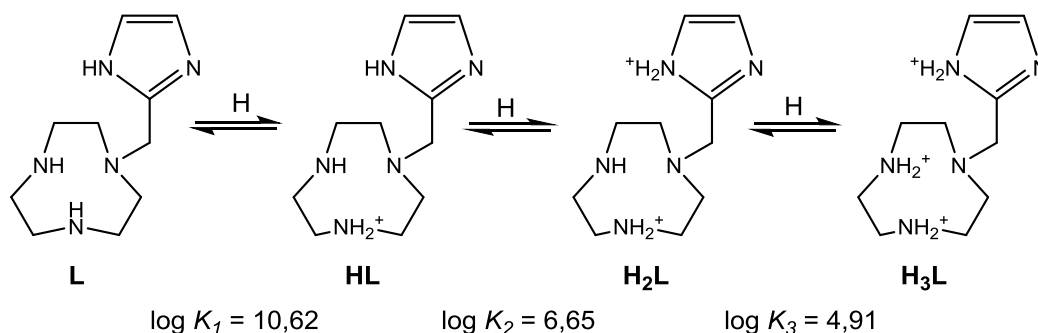
6.2 Studium ligandu **L^{IM}** a jeho komplexů v roztoku

Koordinační schopnosti ligandu **L^{IM}** (v distribučních diagramech a tabulkách uváděn jako L) byly studovány pomocí potenciometrie a elektronové spektroskopie v oblasti UV/Vis pro měďnatý komplex. Potenciometricky byly zjištěny celkové protonizační konstanty ligandu a rovnovážné konstanty stability komplexů pro ionty dvou hlavních biogenních přechodných kovů, Cu²⁺ a Zn²⁺. Pomocí těchto konstant je možné definovat stabilitu a speciaci (z angl. *speciation*) komplexů v roztoku, kterou vyjadřují distribuční diagramy. Pouze se znalostí speciace komplexů v roztoku je možné změřit standardní redoxní potenciály za definovaných podmínek. Aby bylo možné zjistit konstanty stability komplexů, musí být známé acidobazické chování ligandu (tj. celkové protonizační konstanty ligandu).

Titračně byly stanoveny tři celkové protonizační konstanty (β_y) ligandu L^{IM} , které jsou uvedené v *Tab. 2, str. 52* a ze kterých lze vypočítat postupné (konsekutivní) protonizační konstanty ligandu (K_y) podle vztahu (27), *str. 43*. Jejich hodnoty jsou spolu s protonizačními konstantami volného 1*H*-imidazolu a 1,4,7-triazacyklononanu (TACN) uvedeny v *Tab. 5*. První protonizační konstanta ligandu L^{IM} mající hodnotu $\log K_1 = 10,62$ odpovídá protonizaci atomu dusíku makrocyklu (pravděpodobně na sekundárním aminu). Na základě dostupných dat, tj. pouze se znalostí hodnot dalších dvou postupných protonizačních konstant ($K_2 = 6,65$ a $\log K_3 = 4,91$), není možné jednoznačně navrhnout místa dalších protonizací, protože druhá protonizační konstanta pro TACN a protonizační konstanta pro 1*H*-imidazol mají podobné hodnoty, viz *Tab. 5*. Na základě úvah o elektrostatickém odpuzování a možnostech intramolekulárních vodíkových vazeb se dá navrhnout, že druhá protonizace ligandu L^{IM} bude pravděpodobně probíhat co nejdále od makrocyklu, tzn. na imidazolovém kruhu. Třetí protonizace pak pravděpodobně nastane na makrocyklu (pravděpodobně na dalším sekundárním aminu). Schéma popisující vznik trojnásobně protonizovaného ligandu L^{IM} je znázorněno na *Obr. 23, str. 58*. K přesnému určení místa druhé a třetí protonizace by bylo zapotřebí provést NMR titrace, tj. sledovat závislost 1H , ^{13}C a popř. i ^{15}N NMR spekter na pH.

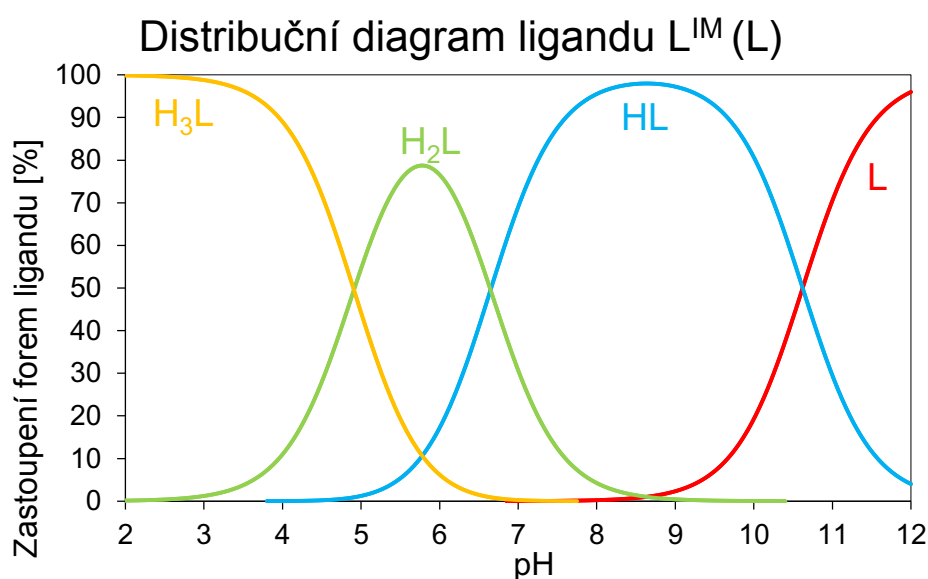
Tab. 5: Hodnoty postupných (konsekutivních) protonizačních konstant ligandu L^{IM} (K_y) a jejich porovnání s protonizačními konstantami mateřského makrocyklu (TACN) [26] a volného 1*H*-imidazolu [27]. V uvedených chemických rovnicích nejsou uvedeny náboje.

Rovnováha	L^{IM}	TACN	1 <i>H</i> -imidazol
	$\log K_y$	pK_y	pK_y
$L + H \rightleftharpoons HL$	10,62	10,60	14,9
$HL + H \rightleftharpoons H_2L$	6,65	6,88	7,0
$H_2L + H \rightleftharpoons H_3L$	4,91	<2,50	–



Obr. 23: Schéma popisující vznik protonizovaného ligandu L^{IM} spolu s hodnotami jeho postupných protonizačních konstant. O druhém a třetím místě protonizace ligandu L^{IM} se dá se získanými daty pouze spekulovat (buď bude protonizace nastávat na 1*H*-imidazolu, nebo na dalším sekundárním aminu makrocyklu). K vytvoření schématu byl použit program ChemDraw Professional 16.0 (PerkinElmer Informatics, Inc., Level Professional, Version 16.0.1.4).

Potenciometrická titrace ligandu L^{IM} byla prováděna v rozmezí pH od 1,8–12,1, na *Obr. 24* je rozmezí mírně zúžené. V počátečním bodě titrace byla přítomna pouze trojnásobně protonizovaná forma ligandu H_3L (na *Obr. 24*: žlutě). Zastoupení této formy klesalo až do úplného vymizení při pH $\approx 7,8$. S tím, jak klesalo zastoupení formy H_3L , rostlo zastoupení dvakrát protonizované formy (na *Obr. 24*: zeleně) ligandu H_2L , která dominuje v rozmezí pH 4,9–6,7 a její maximální zastoupení bylo při pH $\approx 5,8$. V rozmezí pH 6,7–10,7 je majoritní částicí v roztoku monoprotionizovaná forma HL (na *Obr. 24*: modře), jejíž maximální zastoupení je při pH $\approx 8,7$. Při vyšším pH dominuje ve vodném roztoku pouze neutrální forma ligandu L (na *Obr. 24*: červeně).



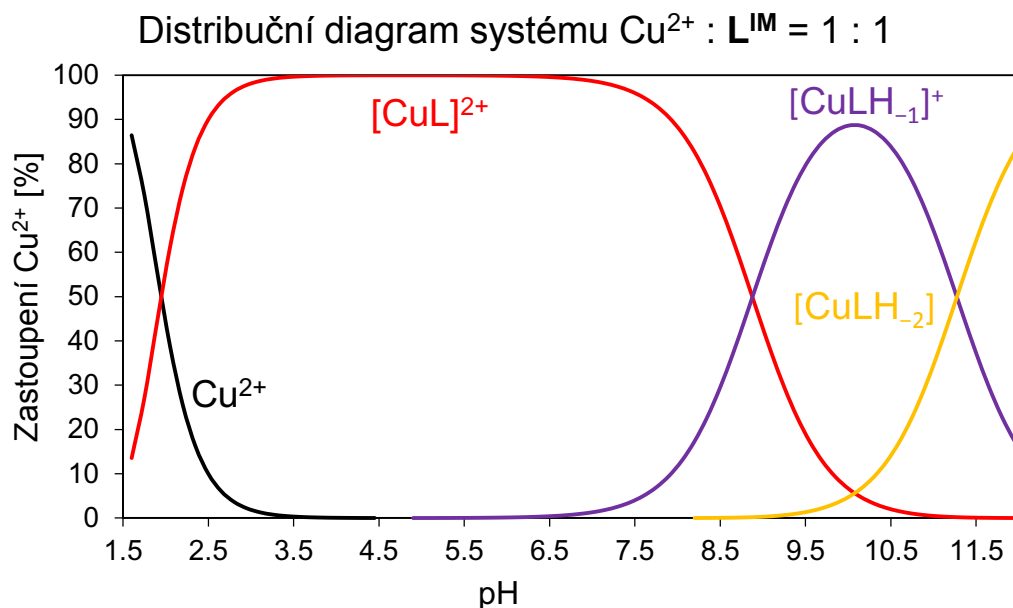
Obr. 24: Distribuční diagram ligandu 1-[(1*H*-imidazol-2-yl)methyl]-1,4,7-triazacyclononanu (L^{IM}), v diagramu označeno jako L. Podmínky titrace: $c_{\text{L}} = 4 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, kde c_{L} je molární koncentrace ligandu L^{IM} ; $I = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NMe}_4\text{Cl}$; 25 °C. Náboje částic nejsou uváděny.

Konstanty stability komplexů ligandu L^{IM} s ionty Cu^{2+} a Zn^{2+} byly počítány z potenciometrických titrací v systému $Cu^{2+} : L^{IM}$ a $Zn^{2+} : L^{IM}$ v molárním poměru 1 : 1. Potenciometrické titrace systémů $Cu^{2+}/Zn^{2+} : L^{IM} = 1 : 2$ nepotvrdily možnost vzniku komplexů $[ML_2]^{2+}$, ani jiných částic, ve kterých by se na jeden centrální ion přechodného kovu koordinovaly dvě molekuly ligandu. Hodnoty celkových rovnovážných konstant stability jsou uvedeny v *Tab. 3, Kapitola 5.2, str. 52*. Postupné rovnovážné konstanty stability komplexů jsou uvedeny v *Tab. 6*. Konstanta stability měďnatého komplexu $[CuL]^{2+}$ je výrazně vyšší než odpovídající konstanta pro zinečnatý komplex, což je v souladu s Irving-Williamsovou řadou.

Tab. 6: Hodnoty postupných rovnovážných konstant stability měďnatého a zinečnatého komplexu (K'_x) pro porovnání.

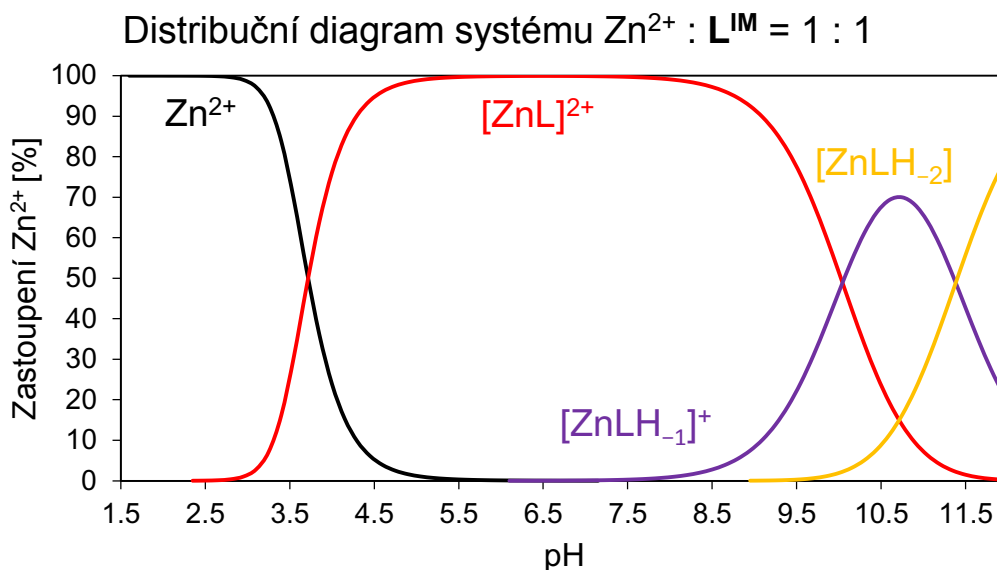
Komplexní částice	Cu^{2+}	Zn^{2+}
	$\log K'_x$	$\log K'_x$
$[ML]^{2+}$	19,037	13,754
$[MLH_{-1}]^+$	8,88	10,043
$[MLH_{-2}]$	11,28	11,385

Potenciometrická titrace systému $Cu^{2+} : L^{IM} = 1 : 1$ byla prováděna v rozmezí pH 1,6–12,1, na *Obr. 25, str. 60* je rozmezí mírně zúžené. Měďnaté kationty tvoří s L^{IM} v tomto rozmezí tři komplexní částice: $[CuL]^{2+}$, $[CuLH_{-1}]^+$ a $[CuLH_{-2}]$. V počátečním bodě titrace při pH $\approx 1,6$ byla většina měďnatých kationtů volná (na *Obr. 25, str. 60*: černě). Měďnaté kationty byly kvantitativně komplexovány ligandem od pH $\approx 3,7$. Měďnatý komplex $[CuL]^{2+}$ je prakticky jedinou komplexní částicí v roztoku až do neutrálního oblasti pH (na *Obr. 25, str. 60*: červeně). Při zvýšení pH roztoku dochází k deprotonizaci komplexu za vzniku komplexních částic $[CuLH_{-1}]^+$ (na *Obr. 25, str. 60*: fialově) a $[CuLH_{-2}]$ (na *Obr. 25, str. 60*: žlutě), které na konci titrace v roztoku dominují. Místo první deprotonizace nelze jednoznačně určit pouhou potenciometrickou titrací. Z tohoto důvodu byla provedena UV/Vis měření komplexu při různých pH, více diskutováno dále. Spektrální měření ukázala, že první deprotonizace komplexu probíhá na imidazolovém kruhu, a tedy druhá deprotonizace vede ke vzniku hydroxokomplexu, tj. $[CuLH_{-2}]$ lze lépe zapsat jako $[CuLH_{-1}(OH)]$, viz *Obr. 28, str. 62*.

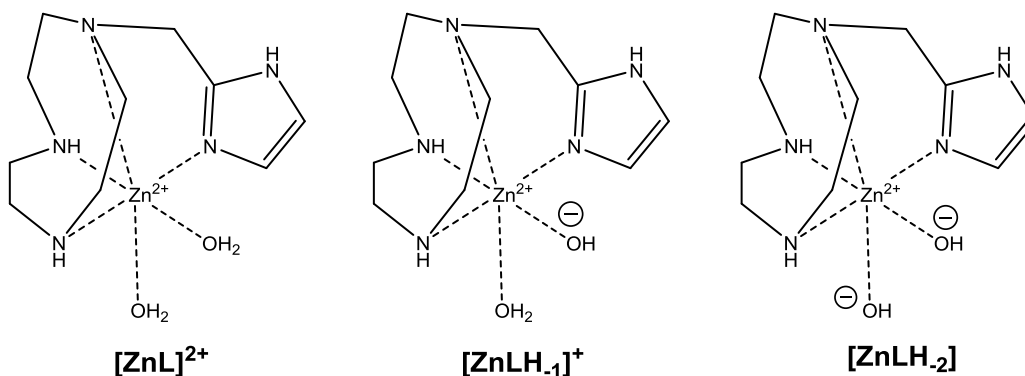


Obr. 25: Distribuční diagram systému $\text{Cu}^{2+} : \text{L}^{\text{IM}} = 1 : 1$, v diagramu je ligand značen jako L. Podmínky titrace: $c_{\text{L}} = c_{\text{M}} = 4 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, kde c_{L} je molární koncentrace ligandu L^{IM} a c_{M} je molární koncentrace Cu^{2+} ; $I = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NMe}_4\text{Cl}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Potenciometrická titrace systému $\text{Zn}^{2+} : \text{L}^{\text{IM}} = 1 : 1$ byla prováděna ve stejném rozsahu pH a výskyt komplexních částic je obdobný jako u systému s měďnatými kationty, viz *Obr. 26, str. 61*. Na počátku titrace při $\text{pH} \approx 1,6$ jsou ve vodném roztoku přítomny pouze volné zinečnaté kationty, které jsou kvantitativně komplexovány až při $\text{pH} \approx 5,5$ (na *Obr. 26, str. 61*: černě). Komplexní částice $[\text{ZnL}]^{2+}$ je v rozmezí $\text{pH} 5,5\text{--}7,5$ prakticky jedinou částicí v roztoku (na *Obr. 26, str. 61*: červeně). Od $\text{pH} \approx 7,5$ začínají v roztoku vznikat deprotonizované komplexní $[\text{ZnLH}_{-1}]^+$ (na *Obr. 26, str. 61*: fialově) a $[\text{ZnLH}_{-2}]$ (na *Obr. 26, str. 61*: žlutě), které dominují od $\text{pH} \approx 10,0$. Na základě všeobecných znalostí koordinační chemie Zn^{2+} (zinečnatý kation nemá tak vysokou afinitu k atomu dusíku 1*H*-imidazolu jako měďnatý kation, a proto nemůže indukovat jeho deprotonizaci) se dá předpokládat, že uvolňování protonů v bazickém roztoku odpovídá deprotonizaci koordinovaných molekul vody za vzniku hydroxokomplexů $[\text{ZnL}(\text{OH})]^+$ a $[\text{ZnL}(\text{OH})_2]$, viz *Obr. 27, str. 61*.



Obr. 26: Distribuční diagram systému $\text{Zn}^{2+} : \text{L}^{\text{IM}} = 1 : 1$, v diagramu je ligand značen jako L. Podmínky titrace: $c_{\text{L}} = c_{\text{M}} = 4 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, kde c_{L} je molární koncentrace ligandu L^{IM} a c_{M} je molární koncentrace Zn^{2+} ; $I = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NMe}_4\text{Cl}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

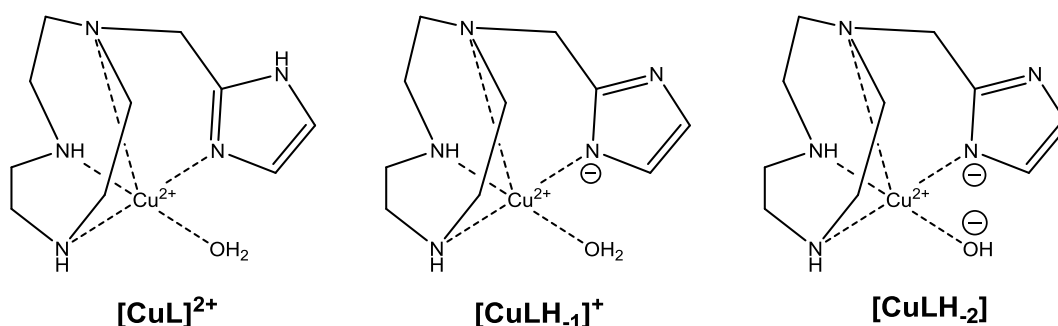


Obr. 27: Schématické znázornění možného uspořádání ligandu L^{IM} a molekul vody v komplexu $[\text{ZnL}]^{2+}$. Dusíkové atomy ligandu makrocyklu se koordinují do dvou ekvatoriálních a jedné axiální polohy z důvodu geometrie devítičlenného makrocyklu. Do dvou dalších ekvatoriálních poloh se koordinuje atom dusíku 1H-imidazolu a molekula vody. Do druhé axiální polohy se koordinuje molekula vody. Ve schématickém znázornění komplexních částic $[\text{ZnLH}_1]^+$ a $[\text{ZnLH}_2]$ jsou patrná místa deprotonizace. K vytvoření schématu byl použit program ChemDraw Professional 16.0 (PerkinElmer Informatics, Inc., Level Professional, Version 16.0.1.4).

Pro potvrzení speciace (Obr. 25, str. 60) bylo provedeno spektrofotometrické měření. Byly měřeny roztoky o pH 6,52 a 10,10 (příprava a postup měření je popsán v Kapitole 4.3.2, str. 44). Hodnoty pH byly zvoleny dle distribučního diagramu (Obr. 25, str. 60), tzn., že při pH = 6,52 byla v roztoku přítomna komplexní částice $[\text{CuL}]^{2+}$ v maximálním zastoupení, zatímco při pH = 10,10 byla v roztoku přítomna primárně deprotonovaná komplexní částice $[\text{CuLH}_1]^+$.

Absorpční křivky jsou ukázány v *Kapitole 5.3* na *Obr. 20* a *Obr. 21*, *str. 53*. Absorpce v oblasti UV kolem 230–330 nm je způsobena přechodem LMCT a pro roztoky o pH = 6,52 a pH = 10,10 se zásadně neliší, maximální absorpce nastává při vlnové délce ≈ 260 nm, viz *Kapitola 5.3*, *Tab. 4*, *str. 54*.

Absorpce ve viditelné oblasti kolem 470–800 nm je způsobena přechody elektronů v rámci *d*-orbitalů. Pro roztok o vyšším pH je absorpční maximum posunuté zhruba o 40 nm do modré oblasti ($\lambda = 612$ nm) oproti roztoku o pH = 6,52, jehož maximální absorpce nastává při 660 nm, viz *Kapitola 5.3*, *Tab. 4*, *str. 54*. Z posunu směrem k vyšším energiím lze usuzovat, že se částice $[\text{CuL}]^{2+}$ se deprotonizuje na atomu dusíku imidazolového kruhu, viz *Obr. 28*, což vede k zesílení koordinace měkkého atomu dusíku v ekvatoriální poloze a tím i zesílení ligandového pole v ekvatoriální rovině. Pokud by se deprotonovala molekula vody v ekvatoriální rovině, měl by nastat posun opačným směrem, tedy do červené oblasti k nižším energiím, vlivem zeslabení ligandového pole v ekvatoriální rovině.



Obr. 28: Schématické znázornění možného uspořádání ligandu L^{IM} a molekul vody v komplexu $[\text{CuL}]^2$. Dusíkové atomy ligandu makrocyklu se koordinují do dvou ekvatoriálních a jedné axiální polohy z důvodu geometrie devítičlenného makrocyklu. Do dvou dalších ekvatoriálních poloh se koordinuje atom dusíku 1*H*-imidazolu a molekula vody. Pravděpodobná koordinace molekuly vody v druhé axiální poloze je, vlivem Jahn-Tellerova efektu, nejspíše natolik slabá, že ji lze zanedbat. Ve schématickém znázornění komplexních částic $[\text{CuLH}_{.1}]^+$ a $[\text{CuLH}_{.2}]$ jsou patrná místa deprotonizace. K vytvoření schématu byl použit program ChemDraw Professional 16.0 (PerkinElmer Informatics, Inc., Level Professional, Version 16.0.1.4).

6.3 Stanovení standardního redoxního potenciálu komplexu

Z důvodu nedostatku času, který byl zapříčiněn obtížemi při syntéze ligandu L^{IM} a následným propuknutím pandemie COVID-19, standardní elektrodový potenciál redoxního páru $[CuL^{IM}]^{2+}/[CuL^{IM}]^{+}$ nebyl změřen.

Předpokladem úspěšného použití makrocyclických komplexů jako modelů aktivních míst proteinů ke sledování přenosu elektronů je vhodná hodnota standardního redoxního potenciálu ($E^0_{ox/red}$), která by se měla co nejvíce blížit hodnotě $E^0_{ox/red}$ redoxního místa proteinu. Aby tedy zkoumaný komplex mohl sloužit jako model aktivního místa azurinu izolovaného z bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, měl by se $E^0_{ox/red}$ blížit hodnotě 310 mV.

7 Závěr

Víceřádkovou syntézou byl připraven ligand L^{IM} . Potenciometrickými titracemi byly stanoveny tři postupné (konsekutivní) protonizační konstanty, které charakterizují acidobazické vlastnosti ligandu L^{IM} , a rovnovážné konstanty stability měďnatého a zinečnatého komplexu, které byly vzájemně porovnány. Spektrofotometrickým měřením byla ověřena speciace měďnatého komplexu v roztoku. Z časových důvodů nebyl standardní redoxní potenciál redoxního páru $[CuL^{IM}]^{2+}/[CuL^{IM}]^+$ stanoven.

Cílem bylo připravit takový ligand, který by dokázal ve vodném roztoku stabilizovat měďnaté i měďné kationty, a zároveň připravit ligand, jehož měďnatý komplex poskytuje standardní redoxní potenciál obdobný $E_{ox/red}^0$ v azurinech.

Přestože navržený ligand L^{IM} přesně nesimuluje koordinační okolí kationtu mědi typu T1 v azurinech, tak obecně jako makrocycklus velmi dobře stabilizuje dvojmocnou (Cu^{II}) i jednomocnou měď (Cu^I) ve vodném roztoku. Relativně vysoká stabilita měďnatého komplexu byla popsána rovnovážnou konstantou stability komplexu, která byla stanovena potenciometrickou titrací. Stanovením standardního redoxního potenciálu by byla potvrzena či vyvrácena možnost využití tohoto ligandu jako nízkomolekulárního modelu aktivního místa azurinu. Ideálním případem by byly makrocyclické ligandy obsahující ve své struktuře minimálně jeden atom síry, ale v rámci této bakalářské práce byl použit synteticky dostupný a relativně bezpečný makrocycklus TACN.

8 Seznam literatury

1. Description Of The Activated Complexes For Electron Transfer. In: *Electron Transfer Reactions of Complex Ions in Solution*. H. Taube (Ed.). Elsevier. Amsterdam (The Netherlands), 1970, p. 27–47. ISBN 978-0-12-683850-3.
2. Chapter 25: d-Block metal complexes: reaction mechanisms. In: *Inorganic Chemistry*. Housecroft C. E.; Sharpe A. G. (Eds.). Pearson Education Limited. Harlow (England), 2005, p. 764–79. ISBN 0-13-039913-2.
3. Winkler, J. R.; Gray, H. B.: Electron Flow through Metalloproteins. *Chem. Rev.*; **114**:7, 3369–80 (2014).
4. Winkler, J. R.; Gray, H. B.: Long Range Electron Tunneling. *J. Am. Chem. Soc.*; **136**:8, 2930–39 (2014).
5. Voityuk, A. A.: Long-Range Electron Transfer in Biomolecules. Tunneling or Hopping?. *J. Phys. Chem. B*. **115**:42, 12202–07 (2011).
6. Cordes. M; Köttgen A.; Jasper C., Jacques O.; Boudebous H.; Giese B.: Influence of Amino Acid Side Chains on Long-Distance Electron Transfer in Peptides: Electron Hopping via “Stepping Stones”. *Angew. Chem. Int. Ed.*; **47**:18, 3461–63 (2008).
7. RapidTables.com: *Electrical calculations & conversion*. Dostupné z URL: <<https://www.rapidtables.com/convert/electric/index.html>> [cit. 23. 7. 2020]
8. van Gastel M.; Coremans W. A.; Mol J.; Jeuken L. J. C.; Canters G. W.; Groenen E. J. J.: The binding of imidazole in an azurin-like blue-copper site. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.*; **4**:3, 257–65 (1999).
9. Gray, H. B.; Winkler, J. R.: Long-range electron transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; **102**:10, 3534–39 (2005).
10. Winkler J. R.; Di Bilio A. J.; Farrow N. A.; Richards J. H.; Gray H. B.: Electron tunneling in biological molecules. *Pure Appl. Chem.*; **71**:9, 1753–64 (1999).
11. Direct Electrochemistry of Proteins and Enzymes. In: *Perspectives in Bioanalysis*. Ferapontova E. E.; Shleev S.; Ruzgas T.; Stoica L.; Christenson A.; Tkac J.; Yaropolov A. I. (Eds.). Elsevier. Amsterdam (The Netherlands), 2005, p. 517–98. ISBN 978-0-444-52150-7.
12. Chapter 28: The trace metals of life. In: *Inorganic Chemistry*. Housecroft C. E.; Sharpe A. G. (Eds.). Pearson Education Limited. Harlow (England), 2005, p. 830–59. ISBN 0-13-039913-2.

13. Liu J.; Chakraborty S.; Hosseinzadeh P.; Yu Y.; Tian S.; Petrik I.; Bhagi A.; Lu Y.: Metalloproteins Containing Cytochrome, Iron–Sulfur, or Copper Redox Centers. *Chem. Rev.*; **114**:8, 4366–69 (2014).
14. Chapter 21: d-Block metal chemistry: the first row metals. In: *Inorganic Chemistry*. Housecroft C. E.; Sharpe A. G. (Eds.). Pearson Education Limited. Harlow (England), 2005, p. 593–640. ISBN 0-13-039913-2.
15. Sigma-Aldrich: *1,4,7,10,13,16-hexathiocyclooctadecane*. Dostupné z URL: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/281271>> [cit. 13. 6. 2020]
16. Bento I.; Martins L. O.; Lpes G. G.; Carrando M. A.; Lindley P. F.: Dioxygen reduction by multi-copper oxidases; a structural perspective. *Dalton Trans.*; 21, 3507–13 (2005).
17. Farver O.; Pecht I.: Electron transfer in blue copper proteins. *Coord. Chem. Rev.*; **255**:7–8, 757–73 (2011).
18. Sheldrick G. M.: Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.*; **71**:1 (art. 1) (2005).
19. Hlinová V.; Jaroš A.; David T.; Císařová I.; Kotek J.; Kubíček V.; Hermann P.: Complexes of phosphonate and phosphinate derivatives of dipicolylamine. *New J. Chem.*; 42:10, 7713–22 (2018).
20. Kývala M.; Lukeš I.: Program for the Determination of Equilibrium Constants from Potentiometric, Spectrophotometric, NMR, and Other Data. At: *4th CHEMOMETRICS'95*, Pardubice (Czech Republic), 1995.
21. Kývala M.; Lubal P.; Lukeš I.: Determination of Equilibrium Constants with the OPIUM Computer Program. At: *9th SIMEC 98*, Girona (Spain), 1998. Dostupné z URL: <<https://web.natur.cuni.cz/~kyvala/opium.html>>
22. Koordinační sloučeniny. In: *Anorganická chemie II. (Systematická část)*, Univerzita Karlova v Praze. Lukeš I.; Mička Z. (Eds.). Karolinum. Praha (Czech Republic), 1998, p. 121–48. ISBN 80-7184-663-5.
23. Benniston A. C.; Gunning P.; Peacock R. D.: Synthesis and Binding Properties of Hybrid Cyclophane-Azamacrocyclic Receptors. *J. Org. Chem.*; 70:1, 115–23 (2005)

24. Beukers M. W.; Chang L. C. W.; von Frijtag Drabbe Künzel J. K.; Mulder-Krieger T.; Spanjersberg R. F.; Brussee J.; IJzerman A. P.: New, Non-Adenosine, High-Potency Agonists for the Human Adenosine A2B Receptor with an Improved Selectivity Profile Compared to the Reference Agonist N-Ethylcarboxamidoadenosine. *J. Med. Chem.*; **47**:15, 3707–09 (2004).
25. Gotzmann C.; Braun F.; Bartholomä M. D.: Synthesis, ⁶⁴ Cu-labeling and PET imaging of 1,4,7-triazacyclononane derived chelators with pendant azaheterocyclic arms. *RSC Adv.*; **6**:1, 119–31 (2016).
26. Katakya R.; Matthes K. E.; Nicholson P. E.; Parker D.; Buschmann H.-J.: Synthesis and binding properties of amide-functionalised polyaza macrocycles. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*; **8**, 1425 (1990).
27. PubChem: *Imidazole*. Dostupné z URL: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/795>> [cit. 8. 8. 2020].